

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Charakterisierung des humanen HCN3-Kanals und seiner cAMP-  
Modulierbarkeit im Vergleich zu den anderen humanen  
HCN-Kanälen**



Georg Stöckl

aus

Wolfratshausen

München 2007

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs.3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom  
15. Januar 2001 von Frau PD Dr. Juliane Stieber und Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 22. Juni 2007

Georg Stöckl

1. Gutachter: PD Dr. Juliane Stieber  
2. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel  
Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 2007  
Eingereicht am: 31. August 2007

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI

## 1. Einleitung .....2

1.1. Die HCN-Kanal Familie.....	2
1.1.1. Struktur von HCN-Kanälen.....	3
1.1.2. Spannungsabhängigkeit und Aktivierungskinetik.....	5
1.1.3. Ionenleitfähigkeit .....	6
1.1.4. Modulation durch zyklische Nukleotide .....	6
1.1.5. Modulation durch pH und regulatorische Untereinheiten.....	8
1.1.6. Bildung von heteromeren Kanälen.....	8
1.2. Bisher bekannte Eigenschaften von HCN3 .....	9
1.3. Ziele der Arbeit .....	10

## 2. Material und Methoden .....11

2.1. Bakterienkultur.....	11
2.1.1. Verwendeter Bakterienstamm .....	11
2.1.2. Verwendete Plasmide .....	11
2.1.3. Nährmedium und Medienzusätze.....	12
2.1.4. Kultivierung und Stammhaltung .....	12
2.1.5. Transformation von Bakterien .....	13
2.1.5.1. Transfer von DNA in <i>E. coli</i> .....	13
2.1.5.2. Herstellung elektrokompenter Zellen.....	13
2.1.5.3. Durchführung der Elektroporation .....	13
2.2. Molekularbiologische Methoden.....	14
2.2.1. Klonierung der hHCN3-cDNA und der hHCN2/hHCN3 Mutanten.....	14
2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA.....	14
2.2.3. Reinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten .....	15

---

2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	15
2.2.5. Enzymatische Modifikation von DNA.....	15
2.2.5.1. Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen .....	15
2.2.5.2. Dephosphorylierung linearer DNA durch Antarctic Phosphatase .....	16
2.2.5.3. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Quick-Ligase.....	17
2.2.6. Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten .....	17
2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese .....	18
2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	18
2.2.8.1. PCR-Primer .....	19
2.2.8.2. Reagenzien .....	19
2.2.8.3. Standard-PCR.....	19
2.2.9. Sequenzierung von DNA .....	20
2.2.10. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen .....	21
2.2.10.1. Isolierung von Gesamt-RNA.....	21
2.2.11. Radioaktive Northernblot und Dotblot Analyse.....	21
2.2.11.1. Herstellung der radioaktiven hHCN-Sonden .....	21
2.2.11.2. Auftrennung der Gesamt-RNA .....	22
2.2.11.3. Northernblot und Hybridisierung.....	23
2.2.11.4. Dotblot-Analyse .....	24
2.3. Kultur eukaryotischer Zellen.....	25
2.3.1. Verwendete Zelllinien .....	25
2.3.2. Nährmedium und Medienzusätze.....	25
2.3.3. Kultivierung und Stammhaltung .....	25
2.3.4. Transiente Transfektion von HEK 293 Zellen .....	26
2.4. Erstellen von stabilen HEK 293 Zelllinien .....	27
2.4.1. Stabile Transfektion durch Elektroporation .....	27
2.4.2. Kultivierung und Selektion der elektroporierten Zellen .....	27
2.4.3. Herstellung von Gefrierstocks.....	28
2.5. Elektrophysiologische Untersuchungen.....	28
2.5.1. Patch-Clamp Technik .....	28
2.5.2. Meßstand und Geräte .....	30
2.5.3. Verwendete Lösungen und Pipetten.....	30
2.5.4. Pulsprotokolle für die whole-cell Messungen.....	31

---

2.5.5. Auswertung der Meßdaten .....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1. Klonierung und Charakterisierung des humanen HCN3-Kanals (hHCN3) .....	35
3.1.1. Klonierung von hHCN3 aus menschlichem Gesamthirn .....	35
3.1.2. Expressionsmuster von hHCN3 in neuronalen und kardialen Geweben .....	36
3.1.3. Elektrophysiologische Charakterisierung des hHCN3-Kanals .....	37
3.1.3.1. Aktivierungskinetik und spannungsabhängige Aktivierung .....	38
3.1.3.2. Umkehrpotential und Ionenleitfähigkeit .....	40
3.1.3.3. Kanalblock durch Cäsiumionen .....	41
3.1.3.4. Kanalblock durch ZD7288 .....	42
3.1.3.5. Modulation durch zyklische Nukleotide .....	44
3.2. Molekulare Grundlagen für die fehlende cAMP-Modulierbarkeit von hHCN3.....	48
3.2.1. Kontrollexperimente mit den Wildtyp-Kanälen hHCN2 und hHCN3 .....	48
3.2.2. Austausch des gesamten C-Terminus zwischen hHCN2 und hHCN3 .....	50
3.2.3. Austausch des extremen C-Terminus zwischen hHCN2 und hHCN3 .....	53
3.2.4. Austausch der Bindedomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) zwischen hHCN2 und hHCN3 .....	56
3.2.5. Austausch der C-Linker-Region zwischen hHCN2 und hHCN3 .....	58
3.2.6. Austausch von C-Linker und CNBD zwischen hHCN2 und hHCN3 .....	59
3.2.7. Auswirkungen der Punktmutation H425S auf hHCN3 .....	61
3.2.8. Vergleich der Aminosäuresequenzen von C-Linker und CNBD zwischen den einzelnen hHCN-Subtypen .....	62
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>64</b>
4.1. Charakteristische Eigenschaften des humanen HCN3-Kanals (hHCN3) .....	65
4.2. Molekulare Grundlagen für die fehlende Modulation von hHCN3 durch zyklische Nukleotide .....	67
4.3. Ausblick .....	71
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>73</b>

---

**6. Anhang .....73**

6.1. Primer ..... 73

**7. Literaturverzeichnis .....75**

7.1. Zitierte Veröffentlichungen..... 75

7.2. Eigene Veröffentlichungen ..... 80

**Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis**

Abb. 1.1.	Struktur von HCN-Kanälen .....	3
Abb. 1.2.	Potentiell Modell für die Frequenzmodulation in Sinusknotenzellen .....	6
Abb. 2.1.	Aufbau eines Northernblots .....	22
Abb. 2.2.	Patch-Clamp Technik .....	28
Abb. 2.3.	Pulsprotokoll steady-state Ströme .....	30
Abb. 2.4.	Pulsprotokoll Umkehrpotential.....	31
Abb. 2.5.	Pulsprotokoll Kanalblock .....	31
Abb. 3.1.	Westernblot von stabilen hHCN-Zelllinien .....	34
Abb. 3.2.	HCN-Expression in humanen Geweben .....	35
Abb. 3.3.	Elektrophysiologische Messungen von hHCN-Strömen .....	36
Abb. 3.4.	Aktivierungskinetik und spannungsabhängige Aktivierung von hHCN-Kanälen .....	38
Abb. 3.5.	Umkehrpotential der hHCN-Kanäle .....	39
Abb. 3.6.	Kanalblock durch Cäsium .....	40
Abb. 3.7.	Chemische Struktur von ZD7288 .....	41
Abb. 3.8.	Kanalblock durch ZD7288 .....	42
Abb. 3.9.	Modulation von hHCN2 durch cAMP.....	43
Abb. 3.10.	Modulation der hHCN-Kanäle durch cAMP/cGMP .....	44
Abb. 3.11.	Kontrollmessungen mit Wildtyp-Kanälen hHCN2 und hHCN3 .....	48
Abb. 3.12.	Austausch des gesamten C-Terminus von hHCN3.....	49
Abb. 3.13.	Austausch des gesamten C-Terminus von hHCN2.....	50
Abb. 3.14.	Austausch des extremen C-Terminus von hHCN3.....	52
Abb. 3.15.	Austausch des extremen C-Terminus von hHCN2.....	54
Abb. 3.16.	Austausch der CNBD von hHCN3 .....	56
Abb. 3.17.	Austausch des C-Linkers von hHCN3.....	57
Abb. 3.18.	Austausch von CNBD und C-Linker von hHCN3.....	58
Abb. 3.19.	Punktmutation H425S im hHCN3 .....	60
Abb. 3.20.	Sequenzvergleich von CNBD und C-Linker der hHCN-Subtypen .....	62
Abb. 4.1.	Schematische Darstellung des „gating ring“ eines HCN-Kanals .....	68
Tab. 2.1.	Verwendete Plasmide .....	10
Tab. 2.2.	Verwendete Restriktionsenzyme .....	15
Tab. 3.1.	Elektrophysiologische Eigenschaften von hHCN-Kanälen .....	46
Tab. 6.1.	Verwendete Primer .....	73
Gl. 1	Summe zweier Exponentialfunktionen.....	32
Gl. 2	Boltzmann-Funktion .....	32
Gl. 3	Goldman-Hodgkin-Katz Spannungsgleichung .....	33

## Abkürzungsverzeichnis

$\tau$	Aktivierungszeitkonstante $\tau$	$G\alpha_i$	inhibierende $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins
$\Omega$	Ohm	$G\alpha_s$	stimulierende $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins
$\beta_1$ -AR	adrenerger Rezeptor Typ $\beta_1$	<b>G-418</b>	Geneticin
$\mu$ Ci	Mikrocurie	<b>GL</b>	Gleichung
$\mu$ l	Mikroliter	<b>h</b>	Stunde
$\mu$ M	Mikromolar	<b>HCN</b>	“hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel”
<b>A</b>	Ampere	<b>HEK</b>	“human embryonic kidney”
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>HEPES</b>	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
<b>AC</b>	Adenylatzyklase	<b>HP</b>	Haltepotential
<b>Ach</b>	Acetylcholin	$I_{Ca,L}$	L-Typ Calciumstrom
<b>AP</b>	Aktionspotential	$I_{Ca,T}$	T-Typ Calciumstrom
<b>AV</b>	atrioventrikular	$I_f$	Hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom („funny current“)
<b>bp</b>	Basenpaare	$I_h$	Hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat	$I_K$	Kaliumstrom
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	$I_{KACH}$	Acetylcholin-aktivierter Kaliumstrom
<b>cGMP</b>	zyklisches Guanosinmonophosphat	$I_Q$	Hyperpolarisations-aktivierter Kationenstrom („queer current“)
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>kb</b>	Kilobase
<b>CNBD</b>	“cyclic nucleotide binding domain”	<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>CNG</b>	“cyclic nucleotide gated”	<b>kHz</b>	Kiloherz
<b>cpm</b>	“counts per minute”	<b>KO</b>	Knock-out
<b>dATP</b>	Desoxyadenosintriphosphat	<b>l</b>	Liter
<b>dCTP</b>	Desoxycytosintriphosphat	<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>ddNTP</b>	Didesoxynukleosidtriphosphat	<b>M</b>	molar; Mol/l
<b>dGTP</b>	Desoxyguanosintriphosphat	$M_2$	muskarinischer Rezeptor Typ 2
<b>DMEM</b>	Dulbecco’s Modifiziertes Eagle Medium	<b>mA</b>	Milliampere
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>mg</b>	Milligramm
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>min</b>	Minute
<b>dNTP</b>	Desoxynukleosidtriphosphat	<b>MiRP1</b>	“MinK-related protein 1”
<b>dTTP</b>	Desoxythymidintriphosphat	<b>ml</b>	Milliliter
<b>EDTA</b>	Natrium-ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat	<b>mM</b>	Millimolar
<b>EGFP</b>	“enhanced green fluorescent protein”	<b>MOPS</b>	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
<b>EGTA</b>	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N',-tetraessigsäure		
$E_{rev}$	Umkehrpotential		
<b>FCS</b>	“fetal calf serum”		
<b>g</b>	Gramm		
$G\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins		



---

<b>ms</b>	Millisekunde	<b>SOC</b>	“super optimal catabolite repression”
<b>mV</b>	Millivolt	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>nA</b>	Nanoampere	<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>NE</b>	Norepinephrin	<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>OD</b>	optische Dichte	<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)- Methylamin
<b>P</b>	Ionenleitfähigkeit	<b>tRNA</b>	Transfer-RNA
<b>pA</b>	Picoampere	<b>TU</b>	Technische Universität
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	<b>U</b>	Units
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>pF</b>	Picofarad	<b>V</b>	Volt
<b>rpm</b>	Umdrehungen pro Minute	<b>V<sub>1/2</sub></b>	Potential der halbmaximalen Kanalaktivierung
<b>RT</b>	Raumtemperatur	<b>WT</b>	Wildtyp
<b>SD</b>	Standardabweichung		
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat		
<b>sec</b>	Sekunde		

# 1. Einleitung

## 1.1. Die HCN-Kanal Familie

Die Hyperpolarization-activated, Cyclic Nucleotide-gated (HCN)-Kanäle bilden eine Ionenkanalfamilie mit den bisher 4 bekannten Isoformen (Subtypen) HCN1 bis HCN4. Die Kanäle vermitteln einen spannungsabhängigen Ionenstrom, der schon vor knapp dreißig Jahren in kardialen Zellen entdeckt wurde und bei den ersten Charakterisierungen verschiedene Namen erhalten hat:  $I_h$  („hyperpolarization“),  $I_f$  („funny“) bzw.  $I_q$  („queer“) (Noma & Irisawa, 1976; Fain et al., 1978; Brown et al., 1979; Halliwell et al., 1982). Die gängigste Bezeichnung ist heute  $I_h$  (im Herzen  $I_f$ ) und wird deshalb auch in den folgenden Teilen dieser Arbeit verwendet. Im Unterschied zu den meisten anderen spannungsgesteuerten Ionenkanälen wird dieser Strom durch eine Hyperpolarisation, nicht durch eine Depolarisation der Zellmembran aktiviert.

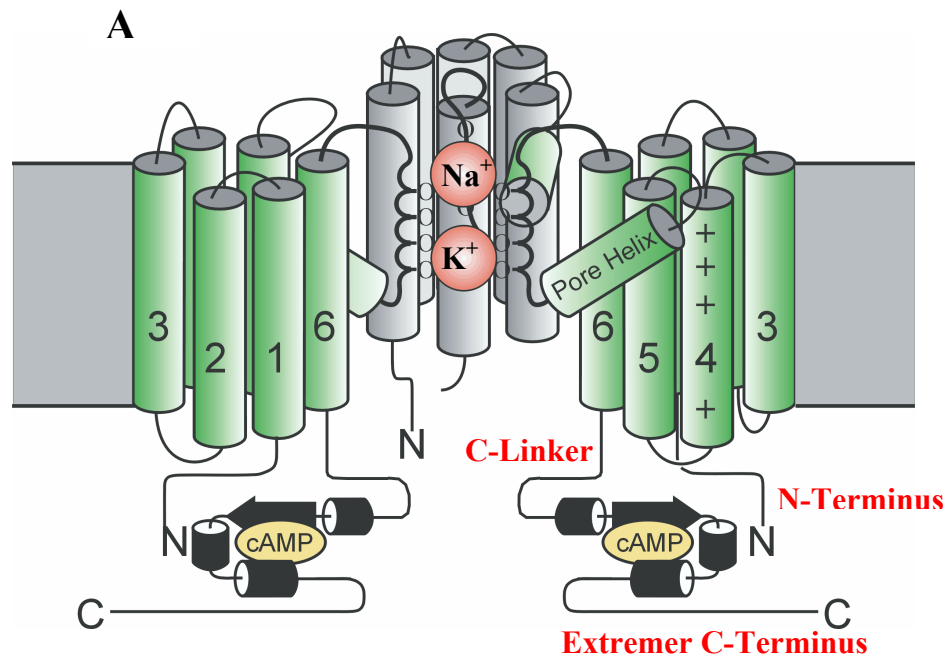
Die Aufklärung der molekularen Grundlage für den  $I_h$ -Strom gelang Ende der Neunziger Jahre mit der Klonierung der verschiedenen HCN-Isoformen (Ludwig et al., 1998; Santoro et al., 1998; Gauss et al., 1998; Ludwig et al., 1999).  $I_h$  findet man in einer ganzen Reihe von Geweben, in erster Linie aber in Gehirn und Herz, wo ihm eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben werden. Er soll z.B. an der Kontrolle der neuronalen und kardialen Schrittmacheraktivität beteiligt sein, deshalb auch die Bezeichnung als „Schrittmacherstrom“ bzw. „Schrittmacherkanäle“ für die HCN-Kanäle. Weitere wichtige Funktionen in der aktuellen Diskussion sind die Kontrolle des Ruhemembranpotentials und der neuronalen Plastizität (Robinson, 2003; Baruscotti, 2005).

Vor allem bei der Steuerung rhythmischer Oszillationen scheint der  $I_h$ -Strom eine wichtige Rolle zu spielen, so z.B. im Thalamus zur Kontrolle des Aufmerksamkeitsverhaltens oder auch in speziellen Zellen des kardialen Reizleitungssystems zur Generierung regelmäßiger Aktionspotentiale. Hier führt die Hyperpolarisation am Ende eines Aktionspotentials zum Einstrom von Kationen durch  $I_f$ -Kanäle, wodurch diese zur langsamen Depolarisation der Zelle bis zum Schwellenpotential für ein erneutes Aktionspotential beitragen könnten. Der Beitrag des durch HCN-Kanäle vermittelten Stroms zu dieser langsamen Depolarisation, vorrangig im Sinusknoten als dem entscheidenden Schrittmacher, wird allerdings seit längerer Zeit kontrovers diskutiert. Jedoch gibt es inzwischen viele Hinweise, dass vor allem der im Sinusknoten stark

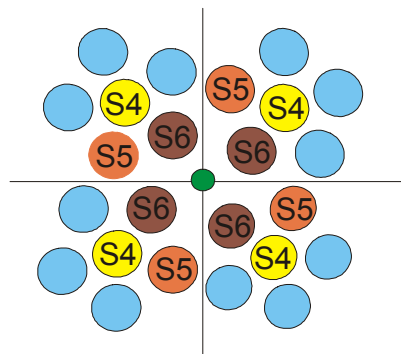
exprimierte Subtyp HCN4 (Ishii et al., 1999) für die Generierung von rhythmischen Schrittmacherpotentialen im Herzen eine entscheidende Rolle spielt (Stieber et al., 2003).

### 1.1.1. Struktur von HCN-Kanälen

Erst die erfolgreiche Klonierung der dem  $I_h$ -Strom zugrunde liegenden HCN-Kanäle und die gezielte heterologe Expression der Kanäle in z.B. HEK293-Zellen oder Oozyten ermöglichte in der Folge die Charakterisierung von Struktur und Eigenschaften. Die bisher in Säugern identifizierten vier Mitglieder der HCN-Kanalfamilie werden anhand ihrer strukturellen Ähnlichkeit den spannungsabhängigen Kationenkanälen zugeteilt. Große Sequenzhomologien bestehen hier wiederum mit den spannungsabhängigen Kaliumkanälen (EAG-Familie) und den CNG (cyclic nucleotide-gated)-Kanälen. Ein funktioneller HCN-Ionenkanal ist aus 4 Monomeren zusammengesetzt, wobei sich sowohl Isoformen desselben Subtyps (Homomultimer), als auch verschiedener HCN-Subtypen (Heteromultimer) zu einem Kanal zusammenlagern können. Ein Monomer gliedert sich wiederum in 6 Transmembransegmente und die cytosolisch gelegenen Amino-(N-) und Carboxy-(C-)terminalen Enden (Abb. 1.1.). Innerhalb der Transmembrandomänen stellt das S4-Segment mit seinen zehn positiven Ladungen den Spannungssensor dar, der auf Änderungen des Membranpotentials reagieren kann. Dies führt durch nicht vollständig geklärte Konformationsänderungen des Proteins zur Öffnung der ionenleitenden Pore, welche von den Transmembransegmenten S5 und S6 gebildet wird. Im C-Terminus befindet sich eine Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD, für „cyclic nucleotide binding domain“), die deutliche Sequenzhomologie zu CNBDs anderer Proteine aufweist. Als Beispiele seien hier die cAMP und cGMP abhängigen Proteinkinasen (Pfeifer et al., 1999) und die CNG-Kanäle (Biel et al., 1999) genannt, wobei zu letzteren die Homologie am größten ist. Der N-Terminus scheint eine wichtige Rolle für die korrekte Zusammenlagerung der 4 Monomere zum funktionsfähigen Kanal zu spielen. Die vier HCN-Subtypen zeigen in den Transmembrandomänen und der CNBD eine ausgeprägte Sequenzhomologie von etwa 90%, während die N- und C-terminalen Regionen zwischen den Subtypen stark variieren. Speziell die Porenregion mit dem Selektivitätsfilter zeigt große Ähnlichkeit mit der Pore von Kaliumkanälen, vermittelt aber überraschenderweise keine Selektivität für Kalium, sondern leitet auch Natriumionen.



**B**



**Abb. 1.1.: Struktur von HCN-Kanälen**

(A) Schematisches Modell von HCN-Kanälen. Gezeigt sind 3 von normalerweise 4 Untereinheiten eines funktionellen Kanals. Eine Untereinheit setzt sich dabei aus 6 helikalen Transmembransegmenten (S1-S6) zusammen, wobei die eigentliche Kanalpore von den Segmenten S5 und S6 gebildet wird. Der Selektivitätsfilter in der Pore ermöglicht die Permeation von Natrium- und Kaliumionen. Das S4-Segment besitzt zahlreiche positive Ladungen und stellt den Spannungssensor dar. Im C-Terminus befindet sich die Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD), die über die sog. C-Linker Region mit dem S6-Transmembransegment verbunden ist. Der N-Terminus ist wichtig für die Multimerbildung aus mehreren Untereinheiten. (B) Modell eines HCN-Tetramers. 4 Monomere lagern sich zu einem tetrameren Kanal zusammen. Die ionenleitende Pore (grün) wird von den Segmenten S5 und S6 gebildet.

Abb. A modifiziert nach Ludwig et al., 1999

### 1.1.2. Spannungsabhängigkeit und Aktivierungskinetik

Wie schon erwähnt, werden HCN-Kanäle spannungsabhängig aktiviert, wobei die Offenwahrscheinlichkeit mit zunehmender Hyperpolarisation der Zellmembran steigt und bei Depolarisation sinkt. Die meisten anderen spannungsabhängigen Ionenkanäle werden dagegen durch Depolarisation der Membran aktiviert.

Im zur Zeit gängigsten Modell für die Aktivierung von HCN-Kanälen spielen vor allem Konformationsänderungen des S4-Transmembransegments (Spannungssensor) eine wichtige Rolle. Dieses reagiert auf Änderungen des Membranpotentials, und zwar mit entweder einer Einwärtsbewegung bei Hyperpolarisation oder Auswärtsbewegung bei Depolarisation (Manniko et al., 2002). Diese Relativbewegung des Spannungssensors von HCN-Kanälen entspricht damit der in Depolarisations-aktivierten Kanälen. Da HCN-Kanäle aber durch Hyperpolarisation geöffnet werden, muss der Spannungssensor mit dem für die Kanalöffnung verantwortlichen Element („activation gate“) genau entgegengesetzt gekoppelt sein als in Depolarisations-aktivierten Ionenkanälen. Vor allem der intrazellulär gelegene S4-S5-Linker scheint für diesen Kopplungsprozess eine wichtige Rolle zu spielen (Chen et al., 2001).

HCN-Kanäle zeigen in Abhängigkeit vom anliegenden Aktivierungspotential eine exponentielle Zunahme des Ionenflusses durch die leitende Kanalpore, wobei die Aktivierungsgeschwindigkeit bei zunehmender Hyperpolarisation des Membranpotentials immer schneller wird. Dadurch wird auch die zur Auswertung der Ströme benutzte Zeitkonstante  $\tau$  einer „gefitteten“ (genäherten) abfallenden Exponentialfunktion bei negativeren Potentialen immer kleiner. Die verschiedenen HCN-Subtypen unterscheiden sich zum Teil deutlich in ihren jeweiligen Aktivierungsgeschwindigkeiten, was eine relativ eindeutige Zuordnung der Isoformen ermöglicht. HCN1 besitzt die schnellste Aktivierungskinetik, gefolgt von HCN2 und HCN3, deren Aktivierungsgeschwindigkeiten ähnlich sind. Mit Abstand am langsamsten wird der durch HCN4-Kanäle vermittelte Strom aktiviert. Sowohl die Aktivierungskinetik, als auch die spannungsabhängige Aktivierung der Kanäle sind stark vom experimentellen Umfeld abhängig. Temperatur, pH-Wert und Zusammensetzung der Messlösungen, aber auch die verwendeten Pulsprotokolle beeinflussen die Ergebnisse erheblich. Deshalb sind nur Messungen unter identischen Bedingungen wirklich miteinander vergleichbar.

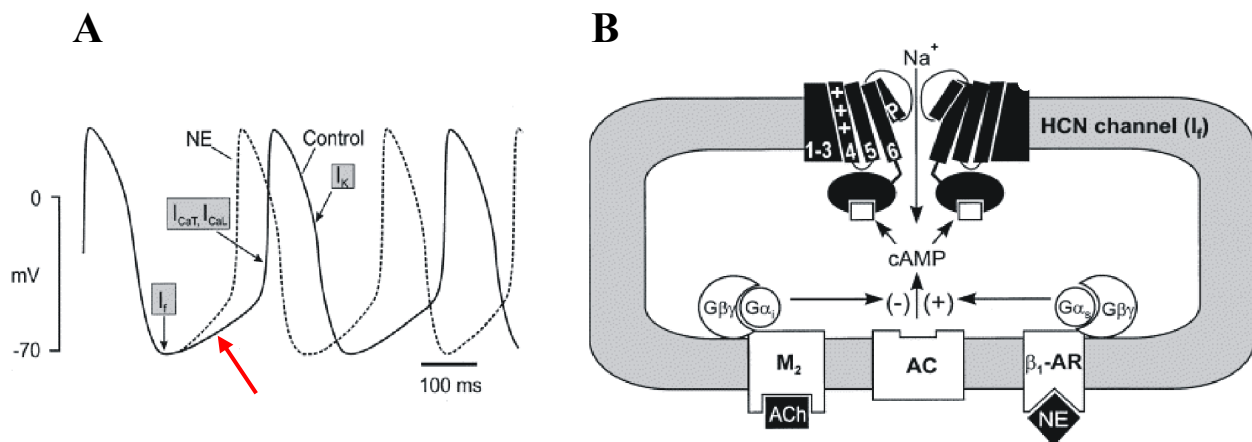
### 1.1.3. Ionenleitfähigkeit

Trotz der großen Homologie zwischen den Porenregionen von HCN-Kanälen und Kaliumkanälen leiten die HCN-Kanäle relativ unselektiv sowohl Kalium- als auch Natriumionen ( $P_{Na}/P_K \sim 0,3$ ). Mit der GYG(Glycin-Tyrosin-Glycin)-Sequenz besitzen auch die HCN-Isoformen das Hauptmotiv des Selektivitätsfilters von Kaliumkanälen (Doyle et al., 1998), tragen aber unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich einen depolarisierenden  $Na^+$ -Einwärtstrom. Die molekularen Grundlagen für diese geringe Selektivität im Gegensatz zu Kaliumkanälen sind bis jetzt noch nicht geklärt, aber es scheinen wohl auch Strukturen außerhalb des eigentlichen Filters eine wichtige Rolle für die Regulation der Ionenleitfähigkeit zu spielen.

### 1.1.4. Modulation durch zyklische Nukleotide

Wie die verwandten CNG-Kanäle besitzen auch die HCN-Kanäle eine CNBD (cyclic nucleotide binding domain) und sind direkt durch zyklische Nukleotide (cAMP bzw. cGMP) modulierbar. Dabei ist der Effekt von cAMP deutlich stärker ausgeprägt als der von cGMP, von dem wesentlich höhere Konzentrationen für eine Stimulation benötigt werden. cAMP bewirkt eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung in Richtung positiverer Potentiale. Die Membran muss dadurch nicht mehr so stark hyperpolarisiert werden, um den Kanal zu aktivieren. Außerdem verursacht cAMP eine Steigerung der Aktivierungsgeschwindigkeit, der steady-state Strom bei einem bestimmten Potential wird also schneller erreicht. In diesem Zusammenhang wird auch eine wichtige Rolle der HCN-Kanäle in der Regulation der Herzfrequenz durch das autonome Nervensystem diskutiert. Durch Stimulierung des Sympatikus über adrenerge  $\beta_1$ -Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung von intrazellulärem cAMP, was wiederum eine direkte Aktivierung des  $I_h$ -Stroms zur Folge hat (DiFrancesco & Tortora, 1991). Dieser Kationeneinwärtsstrom könnte dann zu einer beschleunigten diastolischen Depolarisation und somit zu einer Steigerung der Herzfrequenz führen (siehe Modell Abb. 1.2.). Allerdings tragen in dieser Phase des Aktionspotentials sicher auch noch andere Ionenkanäle wie T-Typ- und L-Typ Calciumkanäle, oder auch andere Mechanismen zur Regulation bei. Die verschiedenen Isoformen der HCN-Kanäle unterscheiden sich im Ausmaß ihrer Modulierbarkeit durch cAMP zum Teil erheblich. Am stärksten sprechen die Isoformen HCN2 und HCN4 auf zyklische Nukleotide an und zeigen dabei eine Verschiebung („shift“) der spannungsabhängigen Aktivierungskurven zu positiveren Potentialen von etwa 15 mV (Ludwig et al., 1999). HCN1 dagegen zeigt nur eine

geringe Reaktion mit einem shift in der Aktivierungskurve von 0 bis 7 mV (Moroni et al., 2001; Ulens & Tytgat, 2001). Über den Mechanismus der Modulation durch cAMP herrschte lange Unklarheit. Erst 2001 schlugen Wainger et al. ein Modell vor. Hierbei spielt vor allem der C-Terminus mit der CNBD eine entscheidende Rolle. Durch Untersuchungen an verschiedenen Kanalchimären und trunkierten Kanälen entwickelten sie die Vorstellung, dass der C-Terminus bei nicht gebundenem cAMP mit den Transmembransegmenten interagiert und so das Kanal gating inhibiert. Es kommt dadurch zu einer Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung zu negativeren Potentialen. Bindet nun cAMP an die Bindungstasche der CNBD, wird diese Inhibierung aufgehoben und der Kanal kann wieder bei positiveren Potentialen aktiviert werden. Durch dieses Modell lassen sich auch die grundsätzlichen Unterschiede in der cAMP-Sensitivität der einzelnen HCN-Isoformen erklären. Die gut modulierbaren HCN2 und HCN4 und der schlecht modulierbare HCN1 zeigen demnach eine unterschiedlich stark ausgeprägte basale Inhibierung durch den C-Terminus. Je stärker diese basale Inhibierung, desto stärker auch der Effekt von cAMP (HCN2 bzw. HCN4). Je schwächer die basale Inhibierung, desto schwächer auch der aktivierende Effekt von cAMP (HCN1). Inzwischen existiert allerdings auch ein anderes Modell (Johnson & Zagotta, 2005), bei dem die 4 C-Termini eines funktionellen Kanals den Ionenfluss unabhängig von den Transmembransegmenten regulieren. Die C-Termini bilden dabei einen sog. „gating ring“, der in der Lage ist, eigenständig und abhängig von der Bindung von cAMP die Kanalaktivität zu kontrollieren.



**Abb. 1.2.: Potentielles Modell für die Frequenzmodulation in Sinusknotenzellen.**

(A) Aktionspotentiale in einer Sinusknotenzelle unter Kontrollbedingungen (durchgezogene Linie) und nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Noradrenalin (NE, gestrichelte Linie). Bei Stimulation steigt die Stromamplitude von  $I_f$ . Durch den verstärkten depolarisierenden Einwärtsstrom wird die diastolische Depolarisation (roter Pfeil) beschleunigt und dadurch die Schwelle für das nächste Aktionspotential schneller erreicht. (B) Regulation des  $I_f$ -Stroms durch die cytosolische cAMP-Konzentration. M2: muskarinischer Rezeptor Typ 2; AC: Adenylatcyclase;  $\beta_1$ -AR:  $\beta$ -adrenerger Rezeptor Typ 1;  $G\alpha_i$ :  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_i$ -Proteins (hemmt AC);  $G\alpha_s$ :  $\alpha$ -Untereinheit des  $G_s$ -Proteins (stimuliert AC). Abb. modifiziert nach Biel et al., 2002

### 1.1.5. Modulation durch pH und regulatorische Untereinheiten

Neben der bekannten Modulation durch zyklische Nukleotide gibt es noch andere Faktoren, die die HCN-Kanäle und ihren Strom  $I_h$  beeinflussen können. Eine wichtige Rolle spielen beispielsweise die intra- und extrazellulären pH-Verhältnisse. Ein niedriger cytosolischer pH-Wert wirkt dabei inhibierend auf den Strom (Munsch & Pape, 1999), während ein niedriger extrazellulärer pH-Wert den Kanal aktiviert. Auf dieser Protonensensitivität beruht zum Teil auch die Wahrnehmung von saurem Geschmack in speziellen Sinneszellen (Stevens et al., 2001). Verantwortlich für die intrazelluläre pH-Sensitivität ist ein Histidin am cytosolischen Ende des S4-Transmembransegments, das als pH-Sensor fungiert (Zong et al., 2001).

In den letzten Jahren gibt es auch vermehrt Hinweise, dass verschiedene Proteinkinasen an der Feinregulation von HCN-Kanälen beteiligt sind. Die Src-Kinase etwa bindet an den Kanal und beschleunigt die Aktivierungskinetik durch Phosphorylierung eines Tyrosin-Restes (Zong et al., 2005). Ein weiteres Beispiel ist die p38 mitogen-activated protein kinase. Wird sie in hippocampalen Pyramidenzellen spezifisch inhibiert, wird auch der  $I_h$ -Strom deutlich herunter reguliert und es kommt zu einer Hyperpolarisation des Membranpotentials (Poolos et al., 2006).

Außer der Interaktion mit speziellen Kinasen konnte auch eine Modulation durch das Protein MiRP1 nachgewiesen werden. Dieses steigert sowohl in heterologen Expressionssystemen (Yu et al., 2001), als auch in ventrikulären Myozyten der Ratte (Qu et al., 2004) die Stromdichte von  $I_h$  und die Aktivierungsgeschwindigkeit des Stroms. Ebenfalls dokumentiert ist die Beeinflussung der Stromkinetik durch das Gerüstprotein Filamin A (Gravante et al., 2004).

Es ist anzunehmen, dass noch etliche cytosolische Proteine identifiziert werden, die als regulatorische Untereinheiten fungieren und Einfluss auf das Gating von HCN-Kanälen ausüben.

### 1.1.6. Bildung von heteromeren Kanälen

Die Möglichkeit der Bildung von heteromeren HCN-Kanälen *in vivo*, also die Aggregation eines funktionellen tetrameren Kanals aus verschiedenen HCN-Isoformen, wird schon seit längerer Zeit kontrovers diskutiert. Da in bestimmten Geweben mehrere HCN-Isoformen gleichzeitig exprimiert werden (Moosmang et al., 1999), wäre die Formation von Heteromeren durchaus denkbar. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass getrennte Kanalpopulationen der jeweiligen Isoform als homomere Kanäle in der gleichen Zelle gebildet werden.



Im Gegensatz zur Situation *in vivo* gibt es etliche Untersuchungen über die Bildung von heteromeren Kanälen in heterologen Expressionssystemen (z.B. HEK293-Zellen oder *Xenopus* Oozyten). Dabei wurden einerseits Tandem-Konstrukte verschiedener HCN-Isoformen verwendet (Ulens et al., 2001), andererseits wurden einzelne Isoformen coexprimiert (Chen et al., 2001; Much et al., 2003). Dabei erhält man  $I_h$ -Ströme mit intermediären Eigenschaften, die sich nicht einer einzigen Isoform zuordnen lassen. Vor allem bei Verwendung von Tandem-Konstrukten spricht dies für die Bildung von heteromeren Kanalproteinen, da ein Mischstrom durch unterschiedliche homomere Kanalpopulationen ausgeschlossen werden kann. Allerdings zeigen diese intermediären Ströme aus Zellkultur-Systemen nicht die Eigenschaften von  $I_h$ -Strömen in nativen Geweben, z.B. dem Sinusknoten (Altomare et al., 2003). Dies liegt möglicherweise am Fehlen von weiteren endogenen Modulatoren der Kanalaktivität in intakten Geweben. In heterologen Expressionssystemen scheinen die HCN-Subtypen 1,2 und 4 also tatsächlich heteromere Kanäle zu bilden, wogegen der endgültige Nachweis der Heteromerbildung *in vivo* für alle Subtypen immer noch aussteht. Lediglich im Maushirn konnte mittels Coimmunopräzipitation eine Interaktion von mHCN1 und mHCN2 gezeigt werden (Much et al., 2003).

## 1.2. Bisher bekannte Eigenschaften von HCN3

Obwohl die HCN-Subtypen 1,2 und 4 in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften in den letzten Jahren detailliert charakterisiert werden konnten, war eine funktionelle Expression des murinen HCN3-Kanals (mHCN3) in heterologen Systemen bisher kaum möglich. Die resultierenden  $I_h$ -Ströme waren in der Regel sehr klein und instabil, so dass nur eine sehr grobe Vorstellung von den Eigenschaften von mHCN3 existierte. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in einer stark ausgeprägten Retention des mHCN3-Proteins im endoplasmatischen Retikulum (persönliche Mitteilung PD Dr. N. Klöcker, Universität Freiburg). Diese wenigen verfügbaren Daten ließen bis jetzt nur eine sehr grobe Einordnung von mHCN3 im Vergleich zu den übrigen Isoformen zu. Diese Untersuchungen deuteten auf eine den anderen mHCN-Isoformen vergleichbare spannungsabhängige Aktivierung hin, wobei die Aktivierungsgeschwindigkeit zwischen der von mHCN2 und mHCN4 lag (Moosmang et al., 2001).

Eine Charakterisierung der Modulation von mHCN3 durch zyklische Nukleotide war aufgrund der genannten Probleme bisher ebenfalls nicht möglich. Erst vor kurzem wurde mit Hilfe eines lentiviralen Expressionssystems eine genauere Beschreibung der elektrophysiologischen Eigenschaften von mHCN3 möglich (Mistrik et al., 2005). Bemerkenswert ist hier vor allem die im Gegensatz zu allen anderen mHCN-Isoformen fehlende Aktivierung des Kanals durch cAMP bzw. cGMP. Tendenziell üben diese Nukleotide sogar einen inhibierenden Einfluss auf Aktivierungskinetik und auch spannungsabhängige steady-state-Aktivierung des Stroms aus. mHCN3 nimmt also in dieser Hinsicht eine Ausnahmestellung in der bisher bekannten HCN-Kanal Familie ein, auch wenn die übrigen grundlegenden elektrophysiologischen Parameter intermediär im Bereich der anderen mHCN-Isoformen liegen.

### 1.3. Ziele der Arbeit

Wie oben dargestellt, gestaltete sich die elektrophysiologische Charakterisierung des mHCN3-Subtyps aufgrund der Expressionsprobleme bis vor kurzem sehr schwierig. Ausgangspunkt dieser Arbeit ist deshalb die erstmalige Klonierung und funktionelle Expression der *humanen* HCN3-Isoform (hHCN3). Da diese Isoform gut zu exprimieren ist und den anderen HCN-Subtypen vergleichbare, stabile Ströme liefert, ist nun eine detaillierte elektrophysiologische Analyse möglich. Diese Charakterisierung soll in dieser Arbeit dargelegt werden, insbesondere sollen die elektrophysiologischen Eigenschaften von hHCN3 mit denen der bereits klonierten anderen 3 Isoformen hHCN1, 2 und 4 verglichen werden. Ein Schwerpunkt liegt dabei auch auf der cAMP-abhängigen Modulation von hHCN3 und den Unterschieden zu hHCN2. Zur Aufklärung der molekularen Grundlagen von Unterschieden in der Modulierbarkeit dienen dabei verschiedene Kanalmutanten bzw. -chimären.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Bakterienkultur

#### 2.1.1. Verwendeter Bakterienstamm

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurde der *E.coli*-Stamm XL-1-blue MRF' (Stratagene) verwendet. Dieser Stamm besitzt den Genotyp  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 } supE44 \text{ thi-1 } recA1 \text{ gyrA96 } relA1 \text{ lac } [F'proAB \text{ lacI}^qZ\Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^R)]$ . Der Bakterienstamm ist speziell für die effiziente Vermehrung von Plasmid-DNA entwickelt worden und enthält zahlreiche Mutationen, die die Stabilität und Expression des transfizierten Plasmids erhöhen. So ist er z.B. defizient für viele zelleigenen Abbau- und Reparatursysteme.

#### 2.1.2. Verwendete Plasmide

Plasmid	Selektions- marker	Eigenschaften	Verwendung	Referenz
pcDNA3- hHCN3 (oder Mutanten)	Amp <sup>R</sup> Neo <sup>R</sup>	pcDNA3- backbone mit hHCN3 (oder Mutanten)	I <sub>h</sub> -Messungen in HEK 293-Zellen	Invitrogen
pAL1 (pUC19- Abkömmling)	Amp <sup>R</sup>	Promotoren für T3- bzw. T7-RNA-Polymerase auf beiden Seiten des Polylinkers eingefügt. Zusätzliche BamHI und Asp718-Schnittstellen.	Subklonierung der hHCN-cDNA-Sonden für Northern- und Dotblot	Ludwig et al. 1997

Tab. 2.1.: Verwendete Plasmide

### 2.1.3. Nährmedium und Medienzusätze

Als Nährmedium wurde LB-Vollmedium mit Glucose (LB+) verwendet, das zur Sterilisation 20 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert wurde.

#### LB-Medium (Luria-Bertani); pH 7,4

Trypton (Oxoid)	10 g
Hefeextrakt (Oxoid)	5 g
NaCl (Roth)	5 g
Glucose (Roth)	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Je nach Resistenz können plasmidtragende Bakterien mit einem Antibiotikum selektioniert werden. Hierzu wurde das  $\beta$ -Laktam Ampicillin als Resistenzmarker verwendet. Eine wässrige Stammlösung mit 50 mg/ml Ampicillin-Na (Sigma) wurde steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Agarplatten wurden mit LB-Medium hergestellt, dem vor dem Autoklavieren 15g Agar/l (Gibco-BRL) zugesetzt wurde. Um das Antibiotikum nicht zu zerstören, wurde das Medium auf etwa 50 °C abgekühlt und anschließend Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugegeben. Anschließend wurde das Medium in sterile Petrischalen gegossen und abgekühlt.

### 2.1.4. Kultivierung und Stammhaltung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB+-Medium. Flüssigkulturen wurden in Plastikröhrchen oder Erlenmeyerkolben angezüchtet, die bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt wurden. Für die Gewinnung von Einzelkolonien und Sicherungsplatten wurde die jeweilige Bakteriensuspension auf LB-Ampicillin-Platten verstrichen und bei 37 °C inkubiert.

*E. coli* Stämme können 4 bis 6 Wochen bei 4 °C auf Agarplatten gehalten werden. Dazu werden Einzelkolonieausstriche über Nacht inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Ausgehend von diesen Kulturen können 25%ige Glycerinkulturen angelegt werden, die bei -80 °C über mehrere Jahre stabil sind.

## **2.1.5. Transformation von Bakterien**

### **2.1.5.1. Transfer von DNA in *E. coli***

Die Einschleusung von Plasmid-DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Dafür benötigt man kompetente Zellen, die in der Lage sind, exogene DNA aufzunehmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Transformationstechnik der Elektroporation zum Einschleusen fremder DNA in Zellen verwendet. Durch einen kurzen Hochspannungsimpuls kann eine lokale Perforation der Zellhülle erreicht werden, die eine Transformation von Plasmid-DNA in die Zelle ermöglicht. Bei geeignetem Selektionsdruck (z.B. durch Zugabe von Antibiotika) wird ein in die Zelle geschleustes Plasmid stabil an die Tochterzellen weitergegeben.

### **2.1.5.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen (Hanahan, 1983, modifiziert)**

LB-Medium wird mit einer *E. coli* Übernachtskultur (XL1-Blue MRF') 1:1000 beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 (logarithmische Wachstumsphase) inkubiert. Die Zellen werden auf Eis abgekühlt und anschließend geerntet. Das Zellpellet wird erst mit eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und anschließend mit eiskalter, 10%iger Glycerinlösung gewaschen. Nach Dekantieren des Überstandes werden die Zellen 1:1 in 10% Glycerin resuspendiert und als 60 µl Aliquots bei -80 °C eingefroren. Die Zellen werden jeweils 10 min mit 4000xg bei 4 °C zentrifugiert. Alle verwendeten Lösungen wurden autoklaviert.

### **2.1.5.3. Durchführung der Elektroporation**

Die elektrokompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit dem gefällten Ligationsansatz (100-500 ng DNA) (2.2.5.3.) oder mit etwa 10 ng Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mit dem Gene Pulser<sup>TM</sup> und Pulse Controller von BioRad mit folgenden Geräteeinstellungen durchgeführt:

Spannung 2,5 kV; Kapazität 25 µF; Widerstand 200 Ω; durchschnittliche Zeitkonstante 4,5 ms. Nach der Transformation wurde zur schnellen Regeneration der Bakterien sofort 1 ml SOC(+) in

<b>SOC(-)-Medium:</b>		<b>SOC(+)-Medium:</b>	
0,52% Hefeextrakt (Oxoid)	0,5 g	SOC(-)-Medium	4,8 ml
2,1% Trypton (Oxoid)	2,1 g	1M MgCl <sub>2</sub>	50 µl
5M NaCl	0,2 ml	1M MgSO <sub>4</sub>	50 µl
1M KCl	0,25 ml	20% Glucose-Lösung	100 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 100,0 ml		

die Küvette pipettiert und diese Mischung dann zur Expression der Antibiotikaresistenz für 60 min bei 37 °C/180 rpm geschüttelt. Anschließend wurde ein Aliquot der Bakteriensuspension auf selektiven LB-Platten ausplattiert. Die erhaltenen Klone konnten mittels Plasmidisolierung (2.2.2.) und entsprechender Restriktionsanalyse (2.2.5.1.) auf Anwesenheit des rekombinanten Plasmids überprüft werden.

## 2.2. Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1. Klonierung der hHCN3-cDNA und der hHCN2/hHCN3 Mutanten

Die humane HCN3-cDNA wurde aus Gesamthirn (QUICK-Clone cDNA, Clontech) kloniert. Hierfür wurde eine Overlap-PCR Strategie verwendet, wobei zwei PCR-Fragmente von 1,1 bzw. 1,3 kB Länge amplifiziert wurden (Primer siehe Tab.). Die beiden Fragmente wurden über eine PflMI-Schnittstelle ligiert und in den Säuger-Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert. Sämtliche anderen Mutanten wurden ebenfalls mit einer Overlap-PCR Strategie hergestellt. Als Schnittstellen für die Klonierung der PCR-Stücke in das Grundgerüst von hHCN3 bzw. hHCN2 (in pcDNA3) wurden dabei PflMI und EcoRI verwendet. Sämtliche Klone wurden anschließend durch direkte Sequenzierung auf Richtigkeit überprüft.

### 2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Gewinnung hochwertiger Plasmid-DNA für Klonierung, Sequenzierung und Elektrophysiologie wurden die kommerziell verfügbaren Plasmid-Isolierungskits Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) bzw. Plasmid Maxi Kit (Qiagen) verwendet. Alle benötigten Puffer und

Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Prinzip dieser Isolierungsmethode ist der Zellaufschluss durch alkalische Lyse (Birnboim & Doly, 1979) und eine anschließende DNA-Aufreinigung mittels Säulenchromatographie. Die Präparation erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

### **2.2.3. Reinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten**

Zur Konzentrierung und Reinigung der Nukleinsäure von Salzen, Proteinen und Polysacchariden, wurde die DNA mit Ethanol gefällt (Sambrook et al., 1989). Dazu wurde die ungereinigte DNA mit 1/10 Volumen 5 M NaCl, dem 2,5 fachen Volumen kaltem 100% Ethanol versetzt und für 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach Zentrifugation bei  $14.000 \times g$  für 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit kaltem 70% Ethanol gewaschen. Nach nochmaligem Zentrifugieren und Entfernen des Überstandes wurde das DNA-Pellet in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac) getrocknet und in sterilem Wasser aufgenommen.

### **2.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine  $\text{OD}_{260}$  von 1,0:

- 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA - 40  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger RNA - 33  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngigem Oligonukleotid.

Die Reinheit von DNA und RNA kann aus dem Verhältnis  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

### **2.2.5. Enzymatische Modifikation von DNA**

#### **2.2.5.1. Spaltung von DNA mittels Restriktionsenzymen**

Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) bilden eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die spezifische Basensequenzen in doppelsträngiger DNA erkennen und spalten (Sambrook et al., 1989). Die hier verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr DNA-Substrat innerhalb oder unmittelbar neben der meist palindromischen Erkennungssequenz, so dass Fragmente mit

definierten Enden entstehen. Je nach Enzym entstehen bei der Spaltung entweder glatte Enden („blunt ends“) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende „sticky ends“. Die DNA-Enden besitzen immer eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe, was die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden ermöglicht.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von NEB bezogen (siehe Tab. 2.1.). Die Erkennungssequenzen, Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen wurden den entsprechenden Produktbeschreibungen des Herstellers entnommen.

Für analytische Zwecke wurden 0,2 bis 0,5 µg DNA mit 3 bis 5 U (Units) Enzym, für die präparative Gewinnung von Restriktionsfragmenten (für Klonierungen) wurden 2 bis 5 µg DNA mit 5 bis 10 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 20 bis 50 µl für 1 bzw. 3 h inkubiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend mittels Gelelektrophorese untersucht.

Enzym	Firma	Erkennungssequenz	Puffer
HindIII	NEB	5'-A/AGCTT-3'	NEB 2
BamHI	NEB	5'-G/GATCC-3'	BamHI-Puffer
EcoRI	NEB	5'-G/AATTC-3'	EcoRI-Puffer
Asp718	Roche	5'-G/GTACC-3'	Asp718-Puffer
XbaI	NEB	5'-T/CTAGA-3'	NEB 2
PflMI	NEB	5'-CCANNNN/NTGG-3'	NEB 3
ScaI	NEB	5'-AGT/ACT-3'	NEB 3
PvuI	NEB	5'-CGAT/CG-3'	NEB 3

Tab. 2.2.: Verwendete Restriktionsenzyme: Schnittstellen sind mit „/“ gekennzeichnet; N steht für ein beliebiges Nucleotid an dieser Position

### 2.2.5.2. Dephosphorylierung linearer DNA durch Antarctic Phosphatase

Antarctic Phosphatase spaltet endständige 5'-Phosphatgruppen von DNA-Molekülen ab. Linearisierte Vektoren wurden dephosphoryliert, um einen intramolekularen Ringschluss (Religation) während der Ligation zu verhindern und so die Klonierungseffizienz von Fremd-DNA zu erhöhen. Zu der gereinigten, linearisierten DNA (etwa 5 pmol) wurden 5 U Antarctic Phosphatase (NEB) und der entsprechende Puffer gegeben und für 60 min bei 37 °C inkubiert.



Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms (5 min, 65 °C) konnte die Vektor-DNA für die Ligation eingesetzt werden.

### 2.2.5.3. Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Quick-Ligase

Die T4-DNA-Quick-Ligase (NEB) katalysiert ATP-abhängig die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende von doppelsträngiger DNA oder RNA. Als Substrat dienen sowohl überhängende als auch glatte Enden. Die Quick-Ligase wurde eingesetzt, um Fremd- und Vektor-DNA kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNA zu verknüpfen. Ligase, linearisierter Vektor und Fremd-DNA (Insert in 2 bis 4-fachem molarem Überschuss) wurden in Ligasepuffer gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend mit Hilfe von t-RNA, Ammoniumacetat (7,5 molar) und Ethanol (100 %) gefällt. Nach Zentrifugation bei 14.000 x g für 20 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde durch Zugabe von 190 µl 70%-Ethanol (RT) und nochmalige Zentrifugation für 10 min gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes und 10 min in der Speed-Vac wurde die DNA in 10 µl Wasser gelöst und das rekombinante Plasmid konnte im Anschluss in *E. coli* transformiert werden (2.1.5.).

### 2.2.6. Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld in einem Gel nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) aufgetrennt. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats sind Nukleinsäuren negativ geladen. Sie wandern daher bei der Elektrophorese zur Anode, und zwar um so langsamer, je größer sie sind. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden sichtbar gemacht werden. Zum Größenvergleich diente ein DNA-Standard (1 kb Ladder, Invitrogen). Um den Verlauf der Elektrophorese zu kontrollieren, wurden dem Auftragspuffer Farbmarker zugegeben. Bromphenolblau wandert mit DNA-Fragmenten von ca. 100 bp und markiert die Elektrophorese-Front. Xylencyanol wandert mit DNA-Fragmenten von etwa 5 kb.

Die zu isolierende DNA-Bande wurde möglichst rasch im UV-Licht sichtbar gemacht, der entsprechende Gelbereich mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-

Reagenzgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mittels Dialyse und anschließender Fällung isoliert (2.2.3.).

**10x TBE**

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA (ICN)	20 mM

**Elektrophoresepuffer**

1x TBE (1 Teil 10x TBE + 9 Teile H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>)

**Auftragspuffer (6x dye)**

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18% (w/v)
EDTA, pH 8,0	0,12 mM
TBE	6x
Bromphenolblau (Serva)	0,1% (w/v)
Xylencyanol FF (Sigma)	0,1% (w/v)

**Ethidiumbromidstammlösung**

10 mg/ml (Sigma), wässrig

### 2.2.7. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten im Bereich von 0,1 bis 15 kb wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al, 1989) verwendet. Für analytische und präparative Zwecke wurden 0,7-2,0% (w/v) Agarose (Seakem LE, Biozym) in 1x TBE im Mikrowellenherd geschmolzen. Vor dem Ausgießen der auf etwa 60 °C abgekühlten Agaroselösung in eine horizontale Kammer wurde Ethidiumbromid zugegeben (finale Konzentration im Gel: 300 ng/ml). Die Elektrophorese erfolgte mit 1x TBE als Laufpuffer bei 80-130 V.

### 2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) ist eine enzymatische Methode zur *in vitro*-Amplifikation von definierten DNA-Segmenten aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Saiki et al, 1988). Sie ist ein zyklisch verlaufender Prozess und beruht auf der Kettenverlängerung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer durch eine hitzestabile DNA-Polymerase. Durch die mehrfache Wiederholung eines Reaktionszyklus (Denaturierung, Primeranlagerung, Polymerisation) wird eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den

beiden Primern liegenden DNA-Abschnittes erreicht. Über Basenaustausche in den Sequenzen der verwendeten Primer ist es möglich, gerichtet Mutationen in der Sequenz des Produktes zu erzeugen, was z.B. die Generierung artifizieller Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme oder den Austausch von Sequenzteilen bzw. einzelner Aminosäuren („site directed mutagenesis“) ermöglicht.

Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode sind vielfältig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR zur Konstruktion von verschiedensten Expressionsplasmiden verwendet, vor allem Mutanten und Chimären von hHCN-Kanälen, aber auch zur Herstellung Northern- bzw. Dotblot-Sonden.

### 2.2.8.1. PCR-Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden von MWG-Biotech, Ebersberg, bezogen. Die Sequenzen sind im Anhang (Tab. 6.1.) aufgelistet. Die lyophilisierte Primer-DNA wurde in soviel  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gelöst, dass die Konzentration 100 pmol/ $\mu\text{l}$  betrug. Davon wurden Arbeitslösungen von 10 pmol/ $\mu\text{l}$  (für PCR) und 0,8 pmol/ $\mu\text{l}$  (für Sequenzierung) hergestellt.

### 2.2.8.2. Reagenzien

Für die PCR-Reaktionen wurde ausschließlich das Phusion High-Fidelity Kit (NEB) verwendet. Sämtliche Reagenzien und Puffer waren dabei im Kit fertig enthalten.

### 2.2.8.3. Standard-PCR

Für die PCR-Reaktionen wurde folgendes Basisprogramm verwendet:

(für DNA-Fragmente bis ca. 1 kb)	
initiale Denaturierung	98°C, 3 min
Denaturierung	98°C, 1 min
Primeranlagerung (Annealing)	59°C, 1 min
Polymerisation (Elongation)	72°C, 30 sec
finale Polymerisation (Elongation)	72°C, 7 min

} 35x

Die Standardbedingungen wurden je nach Größe der zu amplifizierenden DNA-Fragmente (Elongationszeit und –temperatur) und Primersequenzen (Annealingtemperatur) optimiert. Die PCR-Reaktionen wurden im UNO-Thermoblock (Biometra) durchgeführt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente, die für die Konstruktion von Plasmiden eingesetzt wurden, sind aufgereinigt und nach ihrer Klonierung sequenziert worden, um eventuell durch die Polymerase verursachte Fehler zu erkennen.

### 2.2.9. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977). DNA-Fragmente wurden mittels „Terminator Cycle Sequencing“ enzymatisch synthetisiert und durch den Einbau verschiedener, fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) terminiert. Die Sequenzanalyse erfolgte mit einem Sequenzierautomaten („ABI Prism™ Sequence-Analyser“, Perkin-Elmer Applied Biosystems). Dabei erkennt ein Laser die Abfolge der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente, die durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden. Aus den Rohdaten wird von einem Computerprogramm die DNA-Sequenz erstellt.

#### Durchführung des „Terminator Cycle Sequencing“:

Ansatz:	DNA (50-500 ng)	x µl
	Ready Reaction Mix <sup>a</sup> (RRM)	4 µl
	Primer (0,8 pmol/µl)	4 µl
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 20 µl
<sup>a</sup> enthält AmpliTaq DNS Polymerase, Puffer, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Perkin-Elmer Applied Biosystems)		

Synthese der DNA-Abbruchfragmente:

Denaturierung	95°C	2 min	} 25x
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primeranlagerung	50°C	40 sec	
Polymerisation	60°C	4 min	

Die Reinigung des Sequenzierproduktes erfolgte mit „Centri Sep Spin Columns“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) nach Anweisung des Herstellers.

Die getrocknete DNA wurde in 20 µl „Template Suppression Reagent“ (Perkin-Elmer Applied Biosystems) gelöst und vor der Analyse im Sequenzierautomaten 3 min bei 95 °C denaturiert.

### **2.2.10. Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen**

Im Vergleich zu DNA ist RNA deutlich instabiler und somit schwieriger zu handhaben. Deshalb muss beim Arbeiten mit RNA auf jeden Fall eine Kontamination aller Reagenzien, Lösungen und Arbeitsgeräte mit Ribonukleasen vermieden werden. Diese sind äußerst stabile Enzyme, deren Aktivität auch durch z.B. Autoklavieren oder Abkochen kaum vermindert werden kann. Die Inaktivierung dieser Proteine ist durch sehr große Hitzeinwirkung möglich oder durch starke reduzierende Agenzien wie β-Mercaptoethanol oder auch Guanidiniumisothiocyanat (Chirgwin et al., 1979). Es wurden deshalb bevorzugt frische, sterile Plastikgefäße verwendet und alle hitzestabilen Verbrauchsmaterialien wurden zur Ribonuklease-Dekontamination für mindestens 4 h auf 250 °C erhitzt.

#### **2.2.10.1. Isolierung von Gesamt-RNA**

Zur Isolierung von Total-RNA aus HEK 293 Zellen wurde das QIAamp RNA Blood Mini Kit (Quiagen) verwendet. Das Kit erlaubt die direkte Gewinnung von Total-RNA aus kultivierten Zellen unter extrem denaturierenden Bedingungen. Die Präparation erfolgte an Hand des Protokolls des Herstellers. Die Gesamtausbeute an RNA lag dabei in einem Bereich von 0,5-1,5 µg/µl.

### **2.2.11. Radioaktive Northernblot und Dotblot Analyse**

#### **2.2.11.1. Herstellung der radioaktiven hHCN-Sonden**

Die radioaktiven, <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Sonden für die mRNA von humanem HCN1 bis HCN4 wurden mit Hilfe eines Random Primed (Feinberg und Vogelstein, 1983) DNA labeling kits

(Roche Applied Science) und nach Angaben des Herstellers erzeugt. Als Template für die Reaktion dienten dabei spezifische PCR-Fragmente von hHCN1-4 (Primer siehe Tabelle Anhang), wobei die Markierung mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ , Hartmann Analytic) durchgeführt wurde. Nicht eingebautes  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP wurde durch Säulenchromatographie über eine Nick<sup>TM</sup> Column (Amersham Biosciences) entfernt und die spezifische Aktivität der  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonden durch Szintillationszählung (ca.  $1 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{l}$ ) bestimmt. Vor der jeweiligen Hybridisierung wurden die DNA-Sonden 10 min aufgekocht und auf Eis gestellt. Die markierten Sonden wurden sowohl für die Northernblot- als auch für die Dotblot-Analyse verwendet.

### 2.2.11.2. Auftrennung der Gesamt-RNA

Da RNA im Gegensatz zu DNA einzelsträngig ist, neigt sie zu intra- und intermolekularer Basenpaarung. Im Endeffekt führt dies zu verschiedensten Molekülaggregaten und somit vielen unterschiedlichen Banden der gleichen mRNA in der elektrophoretischen Auftrennung. Um dies zu verhindern, werden für die Analyse von RNA meist denaturierende 1% Agarose-Formaldehyd Gele verwendet. Es wurden jeweils 2  $\mu\text{g}$  Total-RNA pro Lane aufgetragen, wobei die Proben vorher mit Formamid-haltigem Ladepuffer im Verhältnis 1:2 versetzt wurden. Zur vollständigen Denaturierung wurden die Proben für 10 min auf 65 °C erhitzt. Die Auftrennung erfolgte mit 1x MOPS als Laufpuffer bei 4° C für 4h bei einer Spannung von 3 V/cm.

Die Gelkammer für die Elektrophorese wurde vorher zur Entfernung von Ribonukleasen mit 3%-iger Formaldehyd-Lösung behandelt (30 min) und anschließend mit autoklaviertem, destilliertem Wasser gründlich gespült.

#### 1% Agarose-Formaldehyd-Gel:

Agarose	0,5 g
1x MOPS	47,3 ml
Formaldehyd 37%	2,7 ml

#### Ladepuffer:

Deionisiertes Formamid	250 $\mu\text{l}$
Formaldehyd 37%	83 $\mu\text{l}$
10x MOPS	50 $\mu\text{l}$
Bromophenolblau 2,5%	10 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	57 $\mu\text{l}$

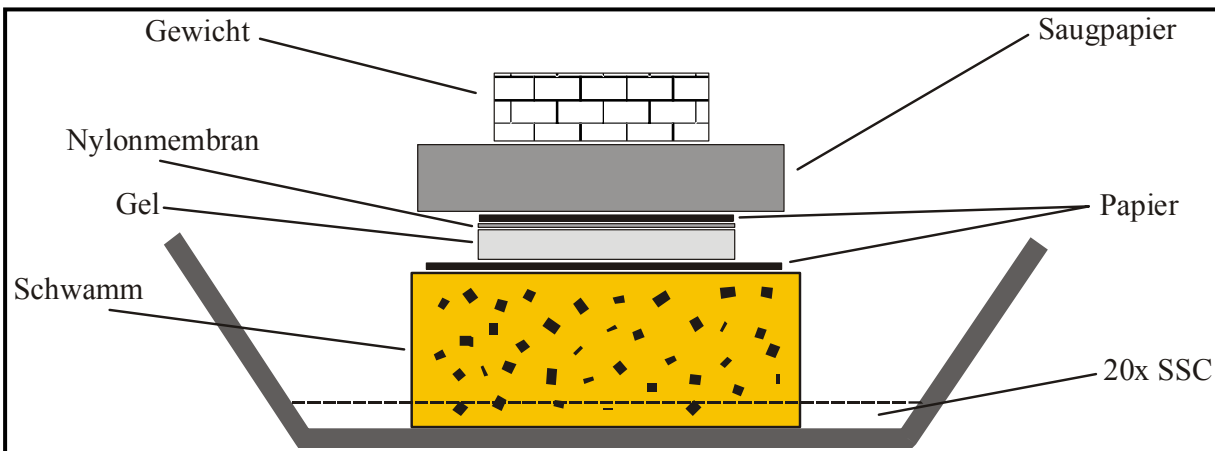
**10x MOPS pH 7,0:**

MOPS	20,92 g
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	
Natriumacetat	3,40 g
EDTA	3,72 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 500 ml

**2.2.11.3. Northernblot und Hybridisierung**

Nach der Elektrophorese wurde das Gel vor dem Blotten mit 20x SSC für 2 x 15 min gewaschen, um überschüssiges Formaldehyd zu entfernen.

In eine Metallwanne (Abb. 2.1.) wurde ein Schwamm gelegt, der etwas größer war als das Gel und dieser gut mit 20x SSC getränkt. Darauf wurden drei Lagen Gelblottingpapier (Whatman GB002) platziert, ebenfalls mit 20x SSC getränkt und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Die in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> getränkte und auf die Größe des Gels zugeschnittene, positiv geladene Nylonmembran (Roche) wurde ebenfalls luftblasenfrei aufgelegt und mit drei Lagen in 20x SSC getränktem Gelblottingpapier abgeschlossen. Durch Auflegen einer, mit ca. 1 kg beschwerten, dicken Lage Zellstoffs auf den Stapel erfolgte über Nacht der Transfer der RNA auf die Trägermembran durch die Kapillarkräfte des Puffers.



**Abb. 2.1.: Aufbau eines Northernblots**

In einer Metallwanne mit 20x SSC wird ein ebenfalls mit 20xSSC getränkter Schwamm platziert. Darauf wird dann schichtenweise dickes Filterpapier, das Gel, eine angefeuchtete Nylonmembran und wieder dickes Filterpapier gelegt. Darauf kommt dann ein Stapel Saugpapier und ein Gewicht. Durch Kapillarkräfte wird die aufgetrennte RNA aus dem Gel mit dem Flüssigkeitsstrom auf die Nylonmembran transferiert. Dort kann sie dann mit UV-Licht fixiert werden.

Nach dem Transfer (12-16 h) wurde der Blot abgebaut, die Geltaschen mit Bleistift markiert und die Membran wie gewünscht zugeschnitten. Zur Immobilisierung der RNA auf der Membran wurde diese mit UV-Licht bestrahlt (Stratalinker, Stratagene).

Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit BD ExpressHyb™ Solution (BD Biosciences Clontech) für 30 min unter Schütteln bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte Sonde mit der Hybridisierungslösung auf ~10x10<sup>6</sup> cpm/ml verdünnt und der Blot über Nacht in einem Plastikbeutel bei 65 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde jeweils zweimal mit 2x SSC und 0,1x SSC bei 65 °C gewaschen, danach erfolgte die Belichtung einer Phosphoimagerplatte für 24h. Diese wurde dann mit einem BAS-1500 Phosphoimager (Fuji) ausgewertet. Der Blot wurde anschließend mit kochender 0,5% SDS-Lösung für 10 min gestrippt und nacheinander mit den hHCN-Sonden hybridisiert.

#### 2.2.11.4. Dotblot-Analyse

Die Dotblot-Analyse wurde mit einem kommerziell erhältlichen „human multiple-tissue expression array“ (BD Biosciences Clontech) durchgeführt, der mit normalisierten Mengen poly A<sup>+</sup> RNA aus verschiedensten menschlichen Geweben beladen war. Das Vorgehen bei Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschritten war dabei das gleiche wie beim Northernblot (2.2.11.3.). Es wurden auch die gleichen radioaktiv markierten Sonden für hHCN1 bzw. hHCN3 benutzt. Unterschiedlich war allerdings die verlängerte Expositionszeit (48h) der Phosphoimagerplatte gegenüber der Membran. Auch der Dotblot wurde einmal mit kochender 0,5% SDS-Lösung für 10 min gestrippt und mit einer weiteren hHCN-Sonde hybridisiert.

##### 20x SSC pH 7,0:

NaCl	87,65 g
Natriumcitrat	44,10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 500 ml

##### Waschpuffer 2x SSC:

20x SSC	50 ml
SDS	5,0 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 500 ml



**Waschpuffer 0,1x SSC:**

20x SSC	2 ml
SDS	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 400 ml

## 2.3. Kultur eukaryotischer Zellen

### 2.3.1. Verwendete Zelllinien

Für die heterologe Expression sämtlicher hHCN-Konstrukte wurde die Zelllinie HEK 293 (ATCC® Nr. CRL 1573; Graham et al., 1977) verwendet. HEK 293 Zellen sind stabil mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transfizierte und auf diese Weise immortalisierte, menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney cells).

### 2.3.2. Nährmedium und Medienzusätze

Als Nährmedium wurde Quantum 286 (PAA Laboratories) verwendet und mit 10.000 U/l Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL) versetzt, um Keimwachstum zu verhindern. Es handelt sich um ein Komplettnährmedium für epitheliale Kulturen, das die Zellen mit Salzen, Glucose, Aminosäuren, Vitaminen, Wachstumsfaktoren, Hormonen und Adhäsionsfaktoren versorgt.

### 2.3.3. Kultivierung und Stammhaltung

HEK 293 Zellen wachsen in adhärennten Kulturen, als sogenannte Monolayer. Zur Kultivierung wurden hierbei sterile Kulturgefäße aus Plastik (TPP, Polystyrol) verwendet. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 8,5% CO<sub>2</sub>, was zu einem konstanten pH-Wert im Nährmedium führte. Falls notwendig, wurden Gefrierstocks der Zellen unter fließendem kalten Wasser aufgetaut, in verschiedenen Mengen auf 3 Kulturflaschen (TPP, 25 cm<sup>2</sup>) aufgeteilt und mit 5 ml Nährmedium ausgesät. Das Medium wurde täglich gewechselt und sobald die Zellen Konfluenz erreicht hatten, konnten sie passagiert und in der gewünschten Dichte neu ausgesät

werden. Hierzu wurde einmal mit 10 ml 1x PBS gewaschen, die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories) geerntet und dann mit 5 ml Medium vereinzelt.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen mussten die Zellen auf Glas-Coverslips ausgebracht werden, um ein Überführen der Zellen in die Extrazellulärlösung für die Messungen zu ermöglichen. Dazu wurde in 24-well Platten (TPP) pro Loch jeweils ein Coverslip gegeben und für 30 min bei 37 °C mit Poly-D-Lysin Lösung (0,1 mg/ml) behandelt, um die Adhäsion der Zellen auf dem Glas zu verbessern. Schließlich wurden die wells noch zweimal mit je 1 ml 1x PBS gewaschen und die Platte unter der Sterilbank getrocknet. Die im Medium vereinzelt Zellen wurden dann in unterschiedlichen Mengen (2500-4000 Zellen) auf die Coverslips ausgesät und mit je 1 ml Nährmedium versehen.

**1x PBS (phosphate buffered saline):**

NaCl	40,0 g
KCl	1,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12 H <sub>2</sub> O	7,2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 5000 ml
pH 7,4 einstellen, autoklavieren	

#### **2.3.4. Transiente Transfektion von HEK 293 Zellen**

Bei der transienten Transfektion von eukaryotischen Zellen wird die Fremd-DNA als zirkuläres Plasmid in die Zelle eingebracht, wobei dieses dann allerdings nach einigen Zellteilungen wieder verloren geht. Um den gewünschten hHCN-Kanal zu exprimieren, wurde die entsprechende cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert und die Plasmide mit Hilfe des Transfektionsreagenzes Fugene 6 (Roche) in die Zellen transfiziert. Hierzu wurde ein Gemisch aus 0,4 µg Plasmid-DNA, 24,4 µl Quantum 286 Medium (ohne antibiotische Zusätze) und 1,2 µl Fugene 6 zu jeweils einem Coverslip einer 24-well Platte mit ausgesäten Zellen gegeben (2.3.3.). Anschließend wurden die Zellen zur Expression der Kanäle für ca. 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 8,5% CO<sub>2</sub> inkubiert und dann die elektrophysiologischen Messungen vorgenommen.

## **2.4. Erstellen von stabilen HEK 293 Zelllinien**

### **2.4.1. Stabile Transfektion durch Elektroporation**

Aufgrund der schlechten Expression von hHCN3 nach transienter Transfektion war es notwendig, von hHCN3 und einigen Mutanten stabile Zelllinien zu generieren. Dabei wird durch Elektroporation lineare DNA in die Zelle eingebracht, da diese besser rekombiniert und effektiver in das Wirtsgenom integriert wird. So kommt es im Idealfall und nach entsprechender Selektion zur stabilen Expression des gewünschten Gens. Für die Transfektion wurden 15 µg des jeweiligen Plasmids mit dem Restriktionsenzym PvuI (NEB) linearisiert, mit einem 0,7%-Agarosegel aufgereinigt, eluiert und gefällt. Die verwendeten HEK 293 Zellen wurden, wie schon beschrieben, kultiviert (2.3.3.) und in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (TPP) ausgesät. Bei ca. 90% Konfluenz wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories) geerntet. Nach Verdünnen mit 8 ml 1x PBS wurde 5 min bei 1000x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und noch zweimal mit 8 ml 1x PBS gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde wieder für 5 min bei 1000x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden schließlich mit 1x PBS in einer Konzentration von 10<sup>7</sup> Zellen /ml resuspendiert. 0,8 ml der Zellsuspension wurden in eine sterile Elektroporationsküvette (Peqlab, Spaltweite 4 mm) gegeben und mit 10-15 µg der linearisierten DNA gemischt. Diese Mischung wurde für 5 min auf Eis gestellt. Die Elektroporation erfolgte dann bei einer Spannung von 1000 V und einer Kapazität von 25µF (Gene Pulser, BioRad). Um das Schließen der Poren zu verlangsamen, wurde der Ansatz anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Nach Verdünnen mit 10 ml Nährmedium wurde der Ansatz gleichmäßig auf drei Peel-off Kulturflaschen (TPP, 150 cm<sup>2</sup>) verteilt und mit 30 ml Medium aufgefüllt. Die transfizierten Zellen benötigten nun 48h Zeit zur Regeneration.

### **2.4.2. Kultivierung und Selektion der elektroporierten Zellen**

Nach einer Regenerationszeit von 48h bei 37 °C und 8,5% CO<sub>2</sub> wurde das normale Nährmedium gegen das Selektionsmedium ausgetauscht. Da erfolgreich transfizierte Zellen eine Neomycin-Resistenz aus dem pcDNA3-Grundplasmid enthalten, sind sie resistent gegenüber einer Behandlung mit dem Antibiotikum G-418. Das Selektionsmedium bestand demnach aus Nährmedium + 400 µg/ml G-418 und wurde über einen Zeitraum von vier Wochen alle vier Tage

gewechselt. Nach diesem Zeitraum hatten sich klar erkennbare Zellkolonien gebildet, die geerntet werden konnten. Hierzu wurde in einer 24-well Platte jeweils 1 ml Selektionsmedium pro well vorgelegt und dann die einzelnen Klone unter einem bifokalen Mikroskop mit Hilfe einer Pipette in jeweils ein well der Platte überführt. In der Folge wurde weiterhin bei 37 °C und 8,5% CO<sub>2</sub> kultiviert, bis nahezu Konfluenz in der 24-well Platte erreicht war. Dann wurden die überlebenden Klone in 12-well Platten passagiert und von dort schließlich in 6-well Platten. Durch den permanenten Selektionsdruck konnten so schließlich erfolgreich transfizierte und den gewünschten Kanal stabil exprimierende Klone identifiziert und elektrophysiologisch vermessen werden.

### **2.4.3. Herstellung von Gefrierstocks**

Zur Herstellung von Gefrierstocks der stabilen Zelllinien wurde eine 150 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (TPP) mit dem jeweiligen Zellklon bis zur maximalen Konfluenz bei 37 °C und 8,5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Medium wurde dann abgesaugt und die Zellen mit 20 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 5 ml Trypsin/EDTA (PAA Laboratories) geerntet. Die Zellen wurden mit 10 ml Medium (ohne antibiotische Zusätze) verdünnt und nicht zu stark vereinzelt. Der Ansatz wurde in ein steriles Röhrchen gegeben, 10 min bei 1000x g zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Schließlich wurden 3 ml Einfriermedium (MEM/FCS + 10% DMSO) zugegeben, der Ansatz gleichmäßig auf Kryoröhrchen verteilt und diese in einer Styroporbox bei -80 °C langsam eingefroren. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Gefrierstocks in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

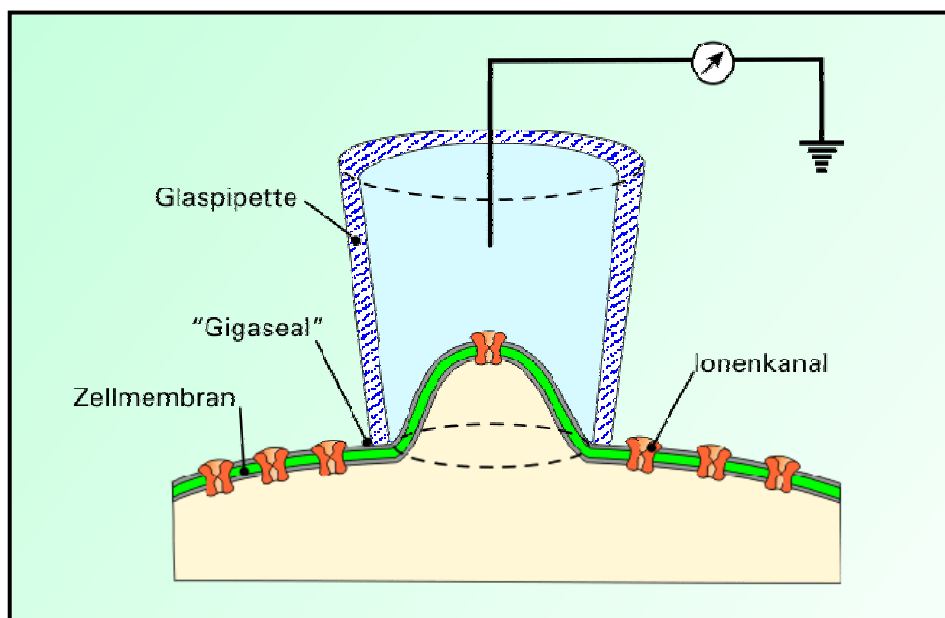
## **2.5. Elektrophysiologische Untersuchungen**

### **2.5.1. Patch-Clamp Technik**

Zur elektrophysiologischen Charakterisierung von hHCN3 und sämtlichen hHCN-Mutanten wurde in dieser Arbeit die Patch-Clamp Technik (Neher und Sakmann, 1976) verwendet. Dabei werden sehr dünn ausgezogene und mit Pipettenlösung gefüllte Glaskapillaren so auf die Membran einer Zelle aufgesetzt, dass eine dichte Verbindung („Gigaseal“) zwischen Zelle und

Pipette entsteht. (Sakmann und Neher, 1984). Erst dadurch wird die rauscharme Messung bestimmter elektrophysiologischer Eigenschaften einer Zelle möglich. Die in HEK 293 exprimierten hHCN-Kanäle wurden dazu in der sog. Ganzzellkonfiguration (whole cell configuration) gemessen. Diese spezielle Konfiguration ist eine Variante der Patch-Clamp Technik, bei der die Zellmembran unter der Pipettenspitze durchbrochen wird, so dass die Pipettenlösung in direktem Kontakt mit dem Cytosol der Zelle steht. Durch die vorgegebene feste Zusammensetzung von Badlösung und Pipettenlösung werden genau definierte Ionenverhältnisse im Intra- und Extrazellarraum erreicht und eine Messung der elektrischen Eigenschaften der kompletten Zellmembran wird möglich (Hamill et al., 1981). Man erfasst so bei der Messung bei einem elektronisch gesteuertem Haltepotential nach Anlegen einer bestimmten Testspannung die Offen- bzw. Geschlossenzustände aller exprimierten hHCN-Kanäle einer Zelle. Das über Bad- und Pipettenelektrode an die Zelle angelegte Haltepotential wird automatisch vom Verstärker konstant gehalten (voltage clamp), wodurch vergleichbare Messungen bei gleichbleibenden Membranverhältnissen und Kanalöffnungszuständen durchgeführt werden können.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde zur Aktivierung der spannungsabhängigen hHCN-Kanäle die Zellmembran in unterschiedlichem Ausmaß hyperpolarisiert und die dadurch entstehenden Einwärtsströme gemessen.



**Abb. 2.2.: Patch-Clamp Technik**

Beim whole-cell Modus wird das Membranstück unter der Glaspipette (gestrichelte Ellipse) durch Anlegen eines leichten Unterdrucks herausgerissen. Dadurch entsteht ein direkter Kontakt zwischen Pipettenlösung und Cytosol.

Abb. nach: Peter Wolber, Patch-Clamp Technik (Wikipedia.de)

### 2.5.2. Meßstand und Geräte

Sämtliche elektrophysiologischen Untersuchungen wurden in einem klimatisierten Raum bei einer Umgebungstemperatur von  $25 \pm 1$  °C durchgeführt. Hierzu wurde ein Axopatch 200B Verstärker (Axon Instruments) verwendet und die Signale über einen Tiefpassfilter mit einer Rate von 2 kHz gefiltert. Die Digitalisierung erfolgte über einen A/D-Wandler (DigiData 1200 Series, Axon Instruments) mit einer Rate von 10 kHz.

Zur Aufzeichnung der Messungen wurde die Software pClamp9 (Axon Instruments/Molecular Devices) verwendet.

### 2.5.3. Verwendete Lösungen und Pipetten

Sämtliche Lösungen wurden wöchentlich frisch hergestellt und bei 4° C aufbewahrt.

Vor der Verwendung wurden sie auf Raumtemperatur erwärmt. Die Bad- bzw. Pipettenlösung wurde vor den Messungen durch einen 0,22 µm-Membranfilter (Renner GmbH) sterilfiltriert.

#### Badlösung pH 7,4:

NaCl	120 mM
KCl	20 mM
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	1 mM
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	1,8 mM
HEPES	10 mM
Glucose*1H <sub>2</sub> O	10 mM

#### Pipettenlösung pH 7,4:

NaCl	10 mM
KCl	30 mM
K-Aspartat	90 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
EGTA	5 mM
HEPES	10 mM

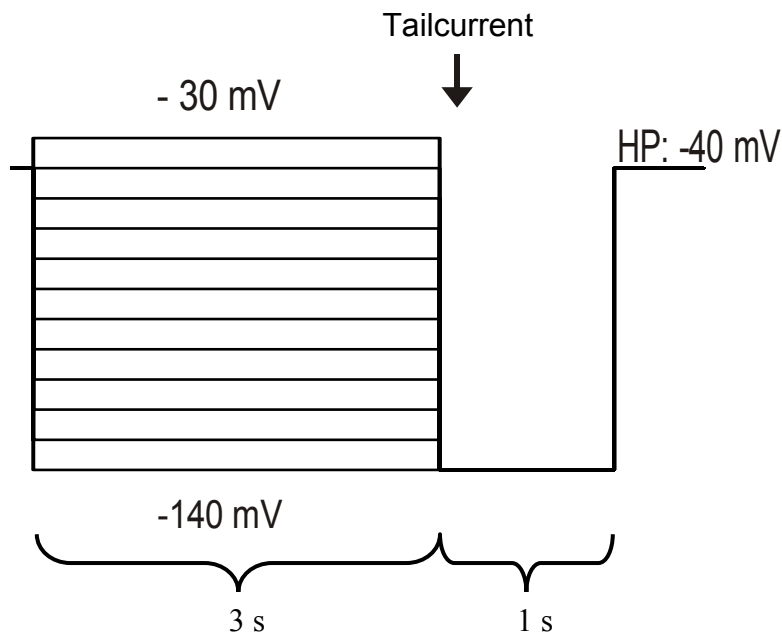
Zur Bestimmung des Effektes von cAMP auf den jeweiligen Kanal wurde der Pipettenlösung 100 µM cAMP (Roche Applied Science) und der Badlösung 100 µM des membrangängigen cAMP-Analogons 8-Br-cAMP (Sigma) zugegeben. Ein Vorrat der Pipettenlösung mit cAMP wurde über den gesamten Messzeitraum auf Eis gekühlt und die Lösung in der Befüllspritze dann stündlich gegen frisch gekühlte Pipettenlösung ausgetauscht. Zur Blockierung von HCN-Kanälen wurden bei Bedarf die Blocker Cs<sup>+</sup> (2 mM) oder ZD7288 (100 µM) in die Badlösung eingespült. Die für die Messungen verwendeten Pipetten wurden aus Borosilikatglas (Harvard Apparatus) mit Hilfe eines horizontalen Ziehgerätes hergestellt (DMZ Universal Puller, Zeitz) und hitzepoliert. Nach

Befüllen mit der Pipettenlösung wiesen sie in der extrazellulären Badlösung einen Widerstand von 2-5 M $\Omega$  auf.

#### 2.5.4. Pulsprotokolle für die whole-cell Messungen

Die Messungen an sämtlichen verwendeten hHCN-Kanälen und den verschiedenen hHCN-Mutanten erfolgten nach folgenden Pulsprotokollen:

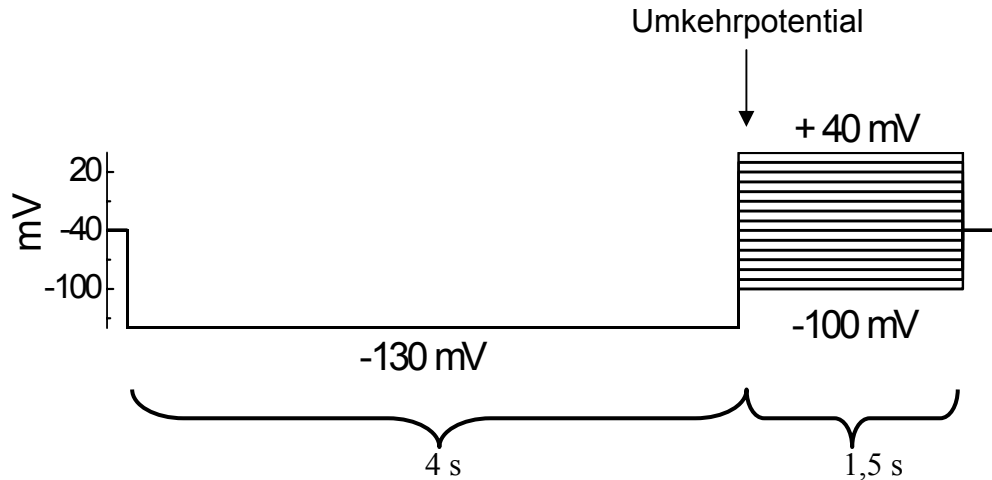
Protokoll für steady-state Ströme:



**Abb. 2.3.: Pulsprotokoll steady-state Ströme**

Das Membranpotential wurde bei sämtlichen Messungen der „steady-state“ Ströme auf -40 mV gehalten (Haltepotential: HP). Um anschließend Einwärtsströme auszulösen, wurden Testpotentiale von -140 mV bis -30 mV in 10 mV-Schritten für jeweils 3 s angelegt, gefolgt von einem Schritt auf -140 mV für 1 s. Dieser zweite Schritt dient der vollständigen Restaktivierung des Kanals und ermöglicht die Auswertung der spannungsabhängigen Aktivierung (siehe 2.5.5.). Der folgende Sprung zurück auf das Haltepotential inaktiviert den Kanal

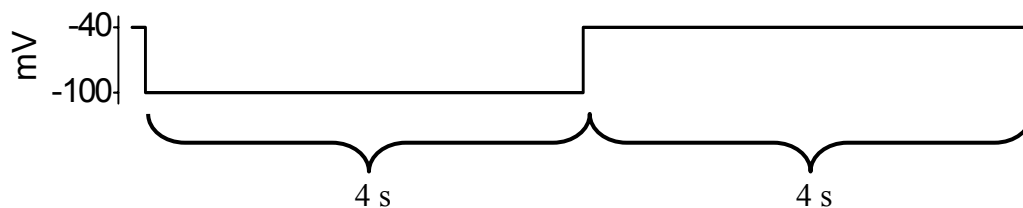
Protokoll für Umkehrpotential:



**Abb. 2.4.: Pulsprotokoll Umkehrpotential**

Zur Bestimmung des Umkehrpotentials („reversal potential“,  $E_{rev}$ ) wurde der Kanal erst mit einem Puls auf  $-130$  mV für 4 s voll aktiviert und anschließend Testpotentiale von  $-100$  mV bis  $+40$  mV für jeweils 1,5 s appliziert. Das Umkehrpotential beschreibt dabei das Potential, bei dem sich die Richtung des Ionenflusses nach außen umkehrt

Protokoll für Kanalblock mit Cäsiumionen bzw. ZD7288:



**Abb. 2.5.: Pulsprotokoll Kanalblock**

Der Effekt von Cäsium und ZD7288 wurde durch wiederholte Aktivierungen von einem Haltepotential von  $-40$  mV auf  $-100$  mV gemessen. Anschließend erfolgte ein Sprung zurück auf das Haltepotential, um den Kanal wieder zu inaktivieren. Nach etwa 5-10 Aktivierungen wurde eine Badlösung mit  $\text{Cs}^+$  bzw. ZD7288 eingewaschen.



### 2.5.5. Auswertung der Messdaten

Zur Auswertung der Aktivierungsgeschwindigkeiten wurde die Aktivierungskonstante  $\tau$  berechnet. Dies erfolgte durch einen fit der jeweiligen Stromspuren bei Potentialen von  $-140$  mV bis  $-100$  mV nach der initialen Verzögerung mit der Summe zweier Exponentialfunktionen:

$$(Gl. 1) \quad y = A_1 e^{\frac{-x}{\tau_1}} + A_2 e^{\frac{-x}{\tau_2}}$$

Hierbei stellen A die Amplitude und  $\tau_1$  bzw.  $\tau_2$  die schnelle und langsame Zeitkonstante der Aktivierung dar.  $\tau_1$  repräsentiert allerdings die eigentliche Aktivierungskonstante, weil bei HCN-Kanälen die schnelle Komponente mit der Amplitude  $A_1$  zu mehr als 90% zur Gesamtamplitude des Stroms beiträgt. Die  $\tau$ -Werte wurden dann graphisch gegen das jeweilige Aktivierungspotential aufgetragen.

Zur Bestimmung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven und des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$  wurden die „Tailcurrents“, die sofort nach der Restaktivierung bei  $-140$  mV (siehe Pfeil Abb.) gemessen wurden, auf die maximale Stromstärke  $I_{\max}$  der Zelle normalisiert und graphisch als Funktion des vorangegangenen Membranpotentials aufgetragen. Die Kurven wurden anschließend mit einer Boltzmann-Funktion gefittet:

$$(Gl. 2) \quad \frac{I - I_{\min}}{I_{\max} - I_{\min}} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{V - V_{1/2}}{k}}} + A_2$$

Dabei ist  $I_{\min}$  ein Offsetstrom, der durch einen Haltestrom ungleich Null verursacht wird, aber nicht in die Stromamplitude mit eingeht.  $V$  ist das Testpotential,  $V_{1/2}$  ist das Potential der halbmaximalen Aktivierung und  $k$  ist der Neigungsfaktor der Kurve.

Zur Bestimmung des Umkehrpotentials („reversal potential“,  $E_{\text{rev}}$ ) wurde der Kanal erst mit einem Puls auf  $-130$  mV voll aktiviert und anschließend Testpotentiale von  $-100$  mV bis  $+40$  mV appliziert (Abb.). Das Umkehrpotential beschreibt dabei das Potential, bei dem sich die Richtung des Ionenflusses nach außen umkehrt. Um die Stromdichte zu erhalten, wurde die Stromamplitude durch die Zellkapazität (ein Maß für die Zellgröße) geteilt und die Stromdichte graphisch als Funktion des Aktivierungspotentials aufgetragen. Die Permeabilitätsrate für Natrium und Kalium ( $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$ ) wurde mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz Spannungsgleichung berechnet:

(Gl. 3)

$$E_{\text{rev}} = -\frac{2.3RT}{F} \log \left( \frac{[K]_{\text{in}} + P_R \times [Na]_{\text{in}}}{[K]_{\text{out}} + P_R \times [Na]_{\text{out}}} \right)$$

Dabei ist  $P_R$  das Verhältnis  $P_{\text{Na}}/P_{\text{K}}$  und  $2.3RT/F = 59,17$  bei  $25$  °C.

Der Effekt von Cäsium und ZD7288 wurde durch wiederholte Aktivierungen von einem Haltepotential von  $-40$  mV auf  $-100$  mV gemessen (Abb.), wobei nach etwa 5-10 Aktivierungen eine Badlösung mit  $\text{Cs}^+$  bzw. ZD7288 eingewaschen wurde. Bei ZD7288 wurde ein steady-state Block nach etwa 3-4 min. erreicht, während der Cäsium-Block nur einige Sekunden benötigte. Der relative Block wurde dabei als verbleibender Strom im Verhältnis zum Maximalstrom vor Applikation der Substanzen berechnet.

Alle Auswertungen erfolgten offline an einem Computer mit Hilfe der Software Origin 6.0 (Microcal). Sämtliche Daten sind als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichung (S.D.) angegeben.  $n$  bezeichnet die Zahl der Experimente. Statistische Unterschiede wurden mit Student's unpaired  $t$  test bestimmt, wobei  $p$ -Werte  $<0,05$  als signifikant angesehen wurden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klonierung und Charakterisierung des humanen HCN3-Kanals (hHCN3)

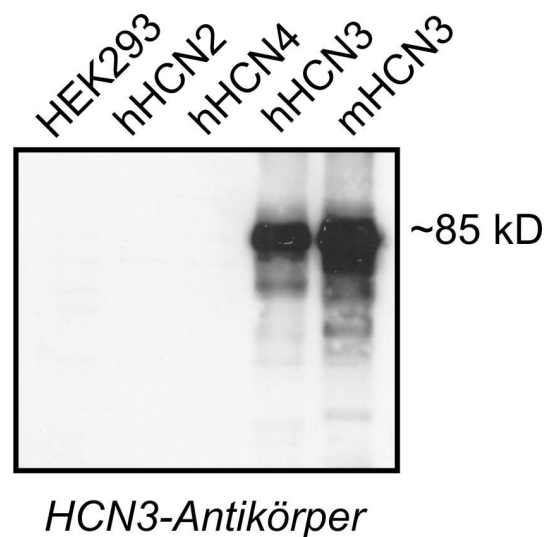
##### 3.1.1. Klonierung von hHCN3 aus menschlichem Gesamthirn

Wegen der schon erwähnten Probleme mit der funktionellen Expression des murinen HCN3 (siehe 1.2.) wurde aus humaner Gesamthirn-cDNA die humane HCN3-Isoform kloniert. Die transiente Expression in HEK293-Zellen zeigte zwar stabile und gut messbare Ströme, allerdings auch große Schwankungen der Stromdichten in den einzelnen Zellen. Ein weiteres Problem der drastischen Überexpression des Proteins in diesem System war die starke Zelltoxizität und mangelnde Effizienz der Transfektion. Dieses Problem macht sich insbesondere auch bei der HCN4-Isoform deutlich bemerkbar. Aus diesem Grund wurden von hHCN3 und auch den übrigen drei humanen HCN-Isoformen stabile Zelllinien erzeugt. Durch die stabile Integration des linearisierten Plasmids in das Genom der Wirtszelle wurden – nach entsprechender Selektion – in den Zellen eines Klons eine konstante Expression des Proteins und relativ gleichmäßige Stromdichten erreicht. Die Expression des korrekten hHCN-Subtyps in den stabilen Linien wurde für die verwendeten Klone durch Westernblot Analyse (Abb. 3.1.) bestätigt.

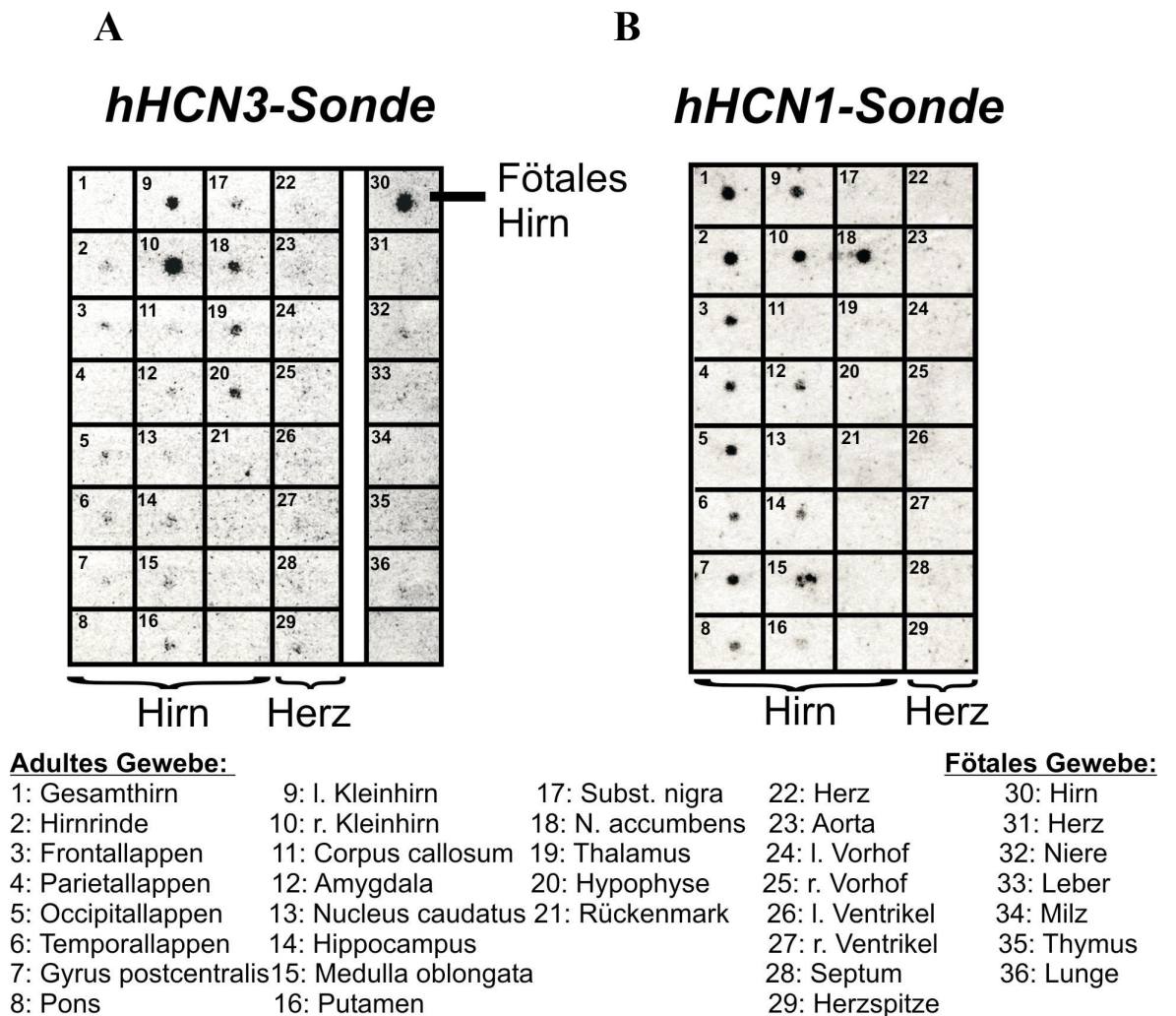
**Abb. 3.1.: Westernblot von stabilen hHCN-Zelllinien**

Aufgetragen sind in den verschiedenen Lanes jeweils 5-10 µg Gesamtprotein aus untransfizierten HEK293-Zellen (ganz links) und stabilen Zelllinien der jeweiligen HCN-Isormen (hHCN2,4,3 bzw mHCN3). Die Auftrennung erfolgte auf einem 7,5% SDS-PAGE Gel, die Detektion nach dem Blotten durch ein Chemilumineszenz-System. Der Antikörper erkennt sowohl die humane als auch die murine HCN3-Isoform.

HCN3-Antikörper erhalten von: Dr. R. Mader, Prof. M. Biel, LMU München



### 3.1.2. Expressionsmuster von hHCN3 in neuronalen und kardialen Geweben



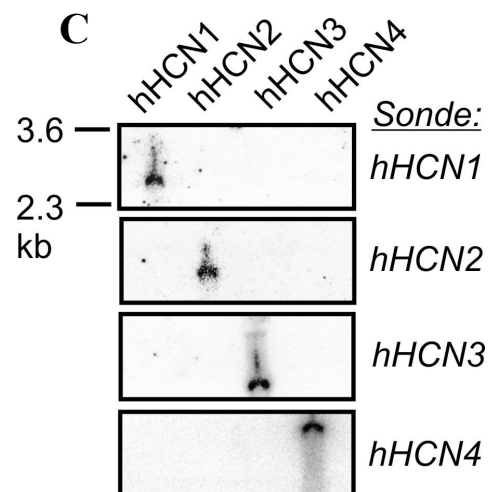
**Abb. 3.2.: HCN-Expression in humanen Geweben**

(A) Humaner mRNA Dot Blot, hybridisiert mit einer spezifischen, radioaktiv markierten hHCN3-Sonde.

(B) Der gleiche Blot wurde gestrippt und erneut mit einer spezifischen hHCN1-Sonde hybridisiert.

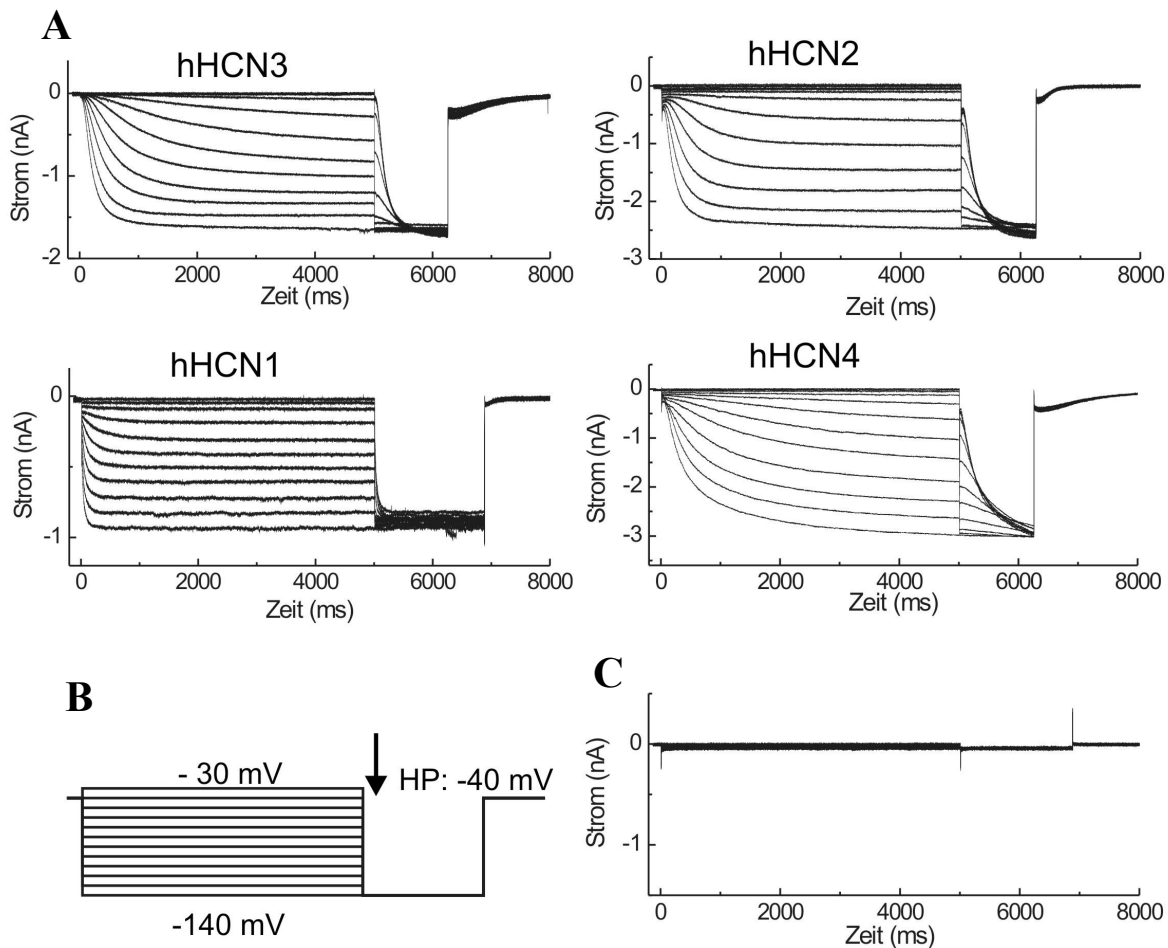
Der Blot wurde beladen mit normalisierten Mengen polyA-RNA aus verschiedenen Hirn- bzw. Herzgeweben.

(C) Northernblot zum Nachweis der Spezifität der hHCN-Sonden. Pro Lane wurden 2 µg Total-RNA aus HEK293-Zellen aufgetragen, die mit dem jeweiligen HCN-Subtyp transfiziert wurden. Der Blot wurde anschließend nacheinander mit allen vier hHCN-Sonden hybridisiert, um Kreuzreaktionen auszuschließen. Alle Sonden stellten sich dabei als spezifisch heraus.



Die Expression von hHCN3 mRNA in Gehirn und Herz wurde mit Hilfe eines radioaktiven Dotblot-Assays untersucht (Abb. 3.2.). Humane HCN3 mRNA konnte dabei in etlichen neuronalen Geweben detektiert werden. Deutliche Signale waren vor allem im Kleinhirn, Nucleus accumbens, Thalamus und in der Hypophyse zu erkennen. Eine starke Expression war auch im fötalen Hirn vorhanden, während hHCN1 mRNA hier überhaupt nicht detektiert werden konnte. Insgesamt war die Expression von HCN3 mRNA in humanen Hirngeweben deutlich geringer als die von HCN1 mRNA, die in vielen Hirnarealen klar nachgewiesen werden konnte. Die starke Expression von HCN1 im Gehirn ist schon aus früheren Studien im Mausmodell bekannt und soll hier als Vergleich dienen. In Herzgewebe war im Dotblot-Assay keiner der beiden Subtypen detektierbar, obwohl hier für HCN1 in anderen Spezies auch positive Nachweise existieren (Shi et al., 1999; Moroni et al., 2001). Vor kurzem wurde mittels RT-PCR – eine weitaus empfindlichere Methode – auch HCN3 mRNA im Mauserzen nachgewiesen (Mistrik et al., 2005).

### 3.1.3. Elektrophysiologische Charakterisierung des hHCN3-Kanals



**Abb. 3.3.: Elektrophysiologische Messungen von hHCN-Strömen**

(A) Stromspuren von transfizierten HEK293-Zellen, die jeweils einen der vier humanen HCN-Kanäle exprimieren. Alle 4 Subtypen zeigen ab einem Potential negativer als  $-50$  mV einen nicht inaktivierenden Einwärtsstrom.

(B) Für die Messung der Stromspuren aus (A) verwendetes Pulsprotokoll. Der erste Aktivierungsschritt bei Potentialen zwischen  $-140$  und  $-30$  mV wurde zur Bestimmung der Aktivierungskinetik verwendet. Der zweite Schritt (jeweils nach den initialen Aktivierungen, siehe Pfeil) zu einem Potential von  $-140$  mV diente der Bestimmung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ). HP: Haltepotential.

(C) Eine untransfizierte HEK293-Zelle zeigt keinen Einwärtsstrom.

Nach der stabilen Expression der verschiedenen hHCN-Isoformen in HEK293-Zellen wurden für die Vermessung und Charakterisierung nur die Klone ausgewählt, die Stromamplitude von etwa  $1 - 3$  nA (bei  $-140$  mV) aufwiesen. Die Kapazität der Zellen, ein Maß für die Größe, lag im Bereich von  $10 - 50$  Picofarad (pF).  $10$  fF entsprechen bei einer annähernd kugelförmigen Zelle etwa  $1 \mu\text{m}^2$ . Abb. 3.3.A zeigt Beispielströme für die vier hHCN-Subtypen, jeweils aufgenommen im whole-cell Modus mit dem Pulsprotokoll aus Abb. 3.3.B. Mit zunehmender Hyperpolarisation der Zellmembran ist auch eine Zunahme der Amplitude des durch Kationen getragenen Einwärtsstroms zu erkennen. Dieser Strom inaktiviert nicht, solange der hyperpolarisierende Puls anliegt. Aus der Abbildung ist außerdem schon die unterschiedliche Kinetik in der Aktivierung der einzelnen Subtypen ersichtlich.

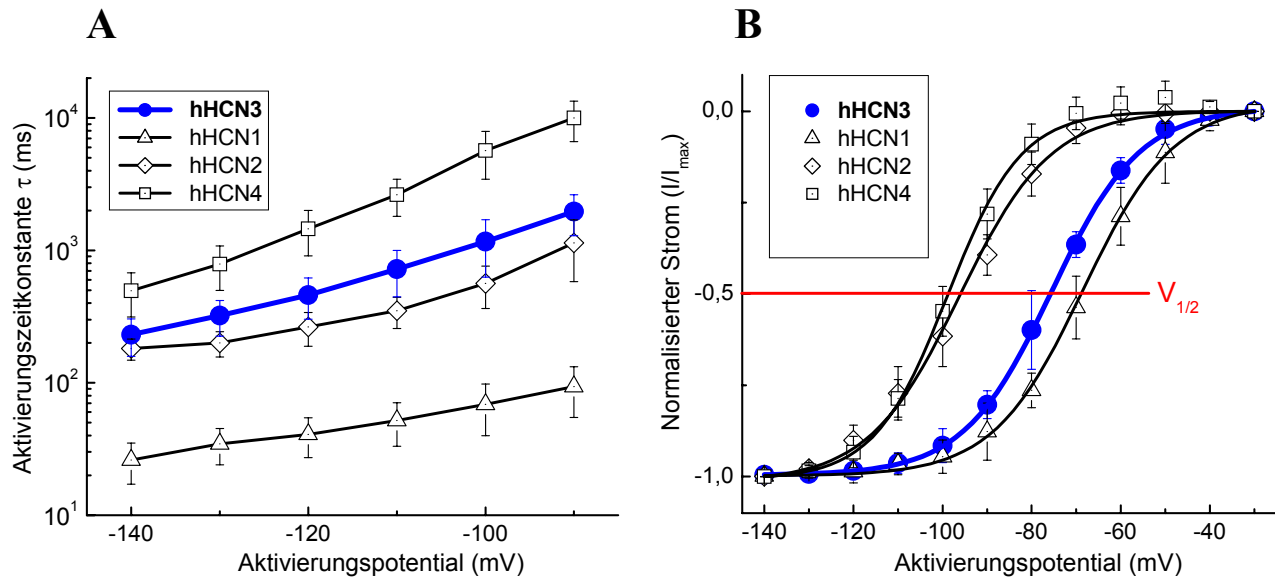
**3.1.3.1. Aktivierungskinetik und spannungsabhängige Aktivierung**

Abb. 3.4.A zeigt die Auswertung der spannungsabhängigen Aktivierungszeitkonstanten  $\tau$  für die verschiedenen hHCN-Subtypen bei Potentialen zwischen  $-140$  mV und  $-90$  mV. hHCN2 und hHCN3 zeigen eine ähnliche Aktivierungskinetik, wobei hHCN3 aber statistisch signifikant langsamer aktiviert. hHCN1 dagegen besitzt eine deutlich schnellere Aktivierungskinetik (kleinere Tau-Werte), hHCN4 eine deutlich langsamere (größere Tau-Werte). Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgende Reihe für die Aktivierungskinetik aufstellen, nach der sich die Subtypen voneinander unterscheiden lassen:

*Schnell*

hHCN1 << hHCN2 < hHCN3 << hHCN4

*langsam*



**Abb. 3.4.: Aktivierungskinetik und spannungsabhängige Aktivierung von hHCN-Kanälen**

(A) Darstellung der spannungsabhängigen Aktivierungszeitkonstanten  $\tau$  für hHCN1-4 bei Potentialen zwischen -140 und -90 mV. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert.

(B) Spannungsabhängige Aktivierungskurven für die 4 hHCN-Subtypen. Die Kurven zeigen einen Boltzmann-Fit der Messdaten. Der Schnittpunkt mit der roten Linie markiert das Potential der halbmaximalen Aktivierung für den jeweiligen Kanal.

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben,  $n = 12 - 20$  Zellen pro Kanalsubtyp.

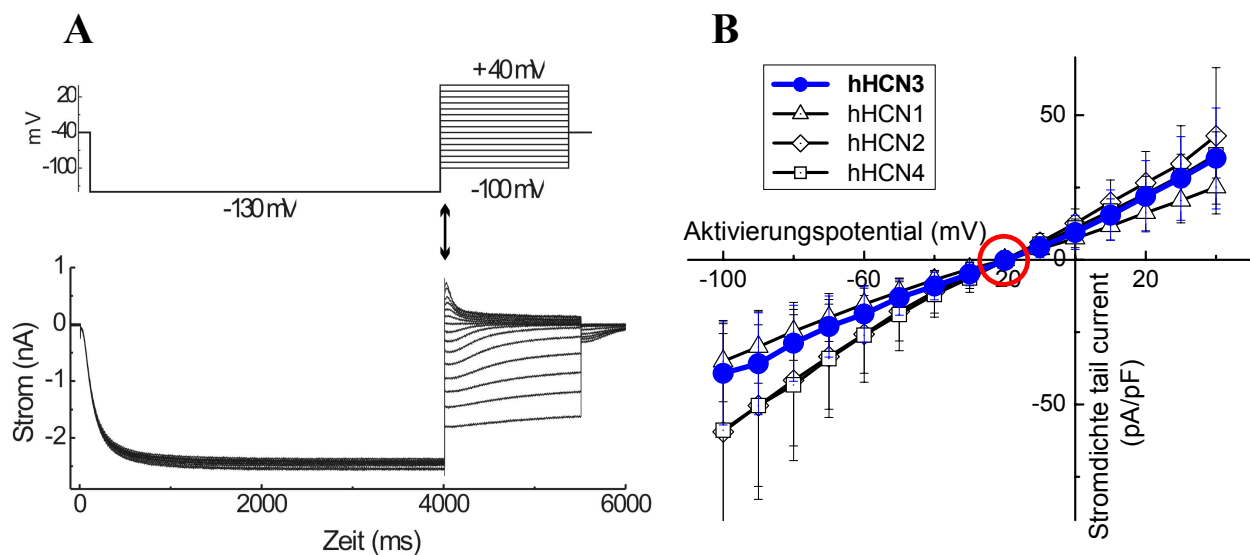
Auch bei Betrachtung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven und des Potentials der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ) nimmt der hHCN3 eine Mittelstellung ein (Abb. 3.4.B). hHCN3 ( $V_{1/2}$ :  $-77.0 \pm 5.3$  mV) wird bei signifikant negativeren Potentialen aktiviert als hHCN1 ( $V_{1/2}$ :  $-69.5 \pm 3.3$  mV), aber bei deutlich positiveren Potentialen als hHCN2 ( $V_{1/2}$ :  $-95.6 \pm 3.8$  mV) und hHCN4 ( $V_{1/2}$ :  $-100.5 \pm 3.3$  mV). Der Unterschied zwischen hHCN2 und hHCN4 ist nicht signifikant. Somit lässt sich auch für die spannungsabhängige Aktivierung eine Reihenfolge aufstellen:

Positive Potentiale      hHCN1 < hHCN3 << hHCN2 = hHCN4      negative Potentiale

Die Unterschiede in der Aktivierbarkeit spiegeln die benötigten Aktivierungsenergien wider. Liegt  $V_{1/2}$  für eine Isoform bei relativ positiven Potentialen (z.B. hHCN1), so ist für die Kanalaktivierung weniger Energie erforderlich als bei Isoformen mit  $V_{1/2}$ -Werten bei negativeren Potentialen (z.B. hHCN2, hHCN4). Hier ist eine stärkere Hyperpolarisation der Zellmembran für die volle Aktivierung der Kanäle nötig.

### 3.1.3.2. Umkehrpotential und Ionenleitfähigkeit

Für alle 4 hHCN-Subtypen ergeben sich beim Umkehrpotential, das etwa bei  $-20$  mV liegt, keine signifikanten Unterschiede (Abb 3.5.B). Bei diesem Potential kehrt sich der Kationenfluss durch den voll aktivierten Kanal nach außen um. Die Strom-Spannungsbeziehung über den gesamten Bereich der Aktivierungspotentiale ist linear. hHCN-Kanäle besitzen also keine bevorzugte Richtung der Leitfähigkeit. Sie weisen somit keine Gleichrichterfunktion auf und stellen deshalb Ohm'sche Kanäle dar.



**Abb. 3.5.: Umkehrpotential der hHCN-Kanäle**

(A) Repräsentative hHCN3 Stromspur. Der Kanal wird erst durch eine Hyperpolarisation bei  $-130$  mV voll aktiviert. Anschließend erfolgt der Schritt zu verschiedenen Testpotentialen, bei denen die jeweilige Stromamplitude (siehe Doppelpfeil) zur Erstellung der Strom-Spannungsbeziehung verwendet wurde. Über der Stromspur ist das verwendete Pulsprotokoll gezeigt.

(B) Strom-Spannungsbeziehung für die 4 hHCN-Isoformen. Alle Kanäle zeigen einen linearen Verlauf und somit keine Gleichrichterfunktion nach innen oder außen. Der rote Kreis markiert das Umkehrpotential  $E_{rev}$ . Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben,  $n = 12 - 20$  Zellen/Kanal.

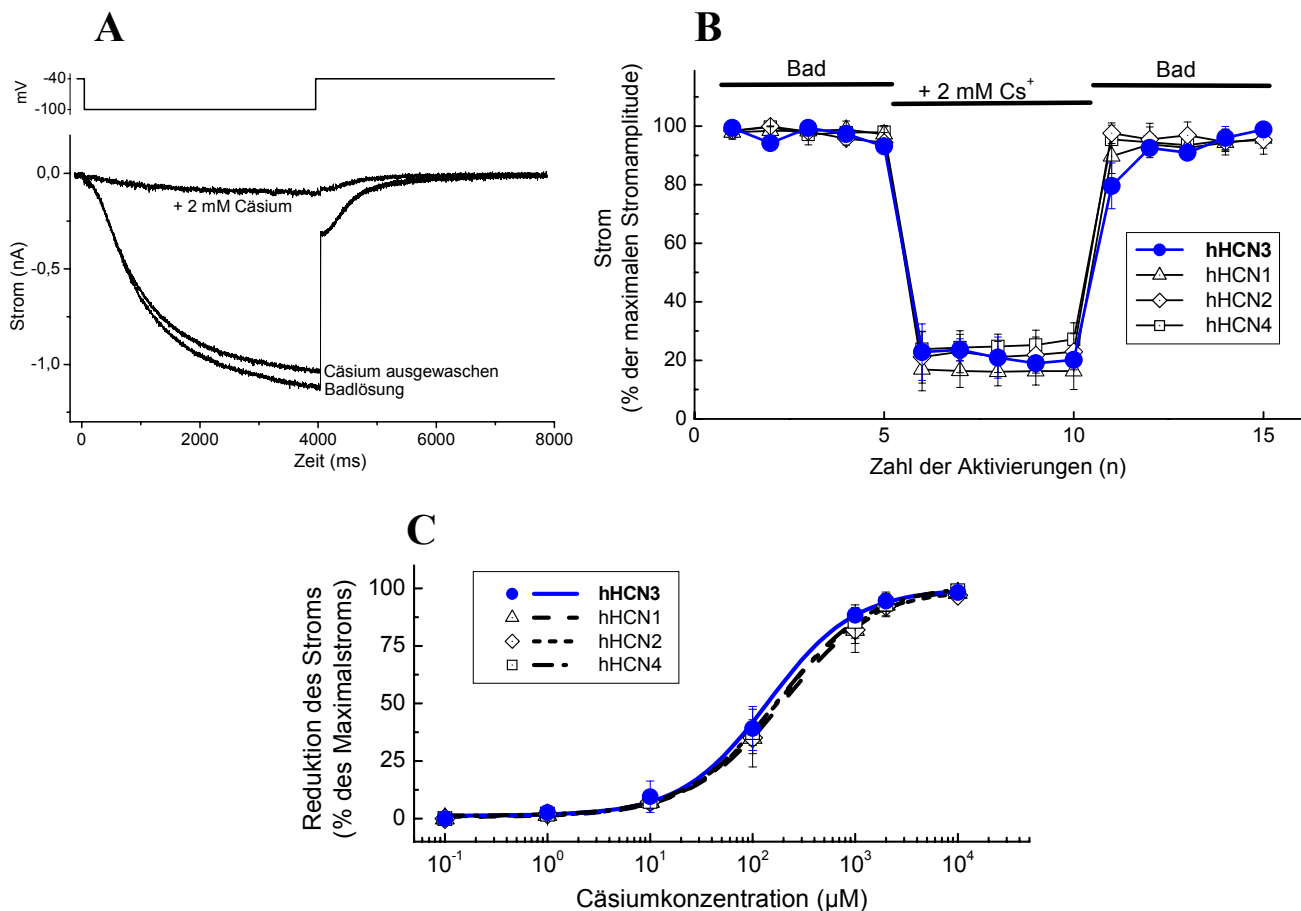
Berechnet man die Ionenleitfähigkeit des hHCN3-Kanals mit Hilfe der Goldman-Hodgkin-Katz Spannungsgleichung (2.5.5.), so ergibt sich eine relative Permeabilität für Kalium und Natrium ( $P_K/P_{Na}$ ) von 3,4. Dies liegt im Bereich der anderen hHCN-Isoformen, d.h. auch hHCN3 leitet Kaliumionen etwa 3 mal besser als Natriumionen, was einem unselektiven Kanal entspricht.

Die grundlegenden elektrophysiologischen Eigenschaften der 4 hHCN-Isoformen sind in Tabelle 3.1. (siehe 3.1.3.5.) noch einmal abschließend zusammengestellt.



### 3.1.3.3. Kanalblock durch Cäsiumionen

Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass extrazelluläre Cäsiumionen den nativen  $I_f$ -Strom reversibel blockieren (DiFrancesco et al., 1982). Diese schnell einsetzende, reversible Blockierung durch Cäsium ist auch bei den klonierten murinen HCN-Subtypen 1,2 und 4 festzustellen (Ludwig et al., 1998; Macri et al., 2004), wobei die Affinitäten der einzelnen Subtypen für den Blocker gleich sind. Auch alle humanen HCN-Subtypen, einschließlich hHCN3, sind durch Cäsiumionen gleich effektiv blockierbar (Abb. 3.6.), es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Der Kanalblock setzt Sekunden nach Einwaschen des Blockers in die Badlösung ein und ist nach Auswaschen mit normaler Badlösung nahezu komplett reversibel.



**Abb. 3.6.: Kanalblock durch Cäsium**

(A) Beispielstromspuren für hHCN3 vor und nach der Applikation von 2mM Cäsium. Der Strom wurde von einem Haltepotential von -40 mV wiederholt durch Schritte auf -100 mV aktiviert. Oberhalb der Stromspur ist das entsprechende Pulsprotokoll gezeigt.

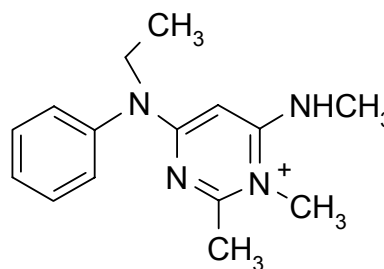
(B) Block aller 4 hHCN-Subtypen durch 2 mM Cäsium. Es zeigt sich kein Unterschied im Ausmaß des Kanalblocks.

(C) Dosis-Wirkungskurven für den Block durch Cäsium für alle 4 hHCN-Subtypen. Die Linien zeigen einen Boltzmann-Fit der Mittelwerte, aus dem die jeweiligen  $IC_{50}$ -Werte berechnet wurden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subtypen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben, n=8 Zellen/Kanal.

Die  $IC_{50}$ -Werte liegen für alle hHCN-Subtypen zwischen 150-200  $\mu M$  (Abb. 3.6.C), was einen relativ hohen Wert für einen Kanalblocker darstellt und Cäsium somit zu einem uneffektiven Blocker macht. Für Untersuchungen an HCN-Kanälen *in vivo* ist Cäsium aufgrund seiner generellen Toxizität nicht geeignet. Außerdem blockiert Cäsium nicht spezifisch nur HCN-Kanäle, sondern beispielsweise auch bestimmte Kaliumkanäle ( $K_{ir}$ ) in erheblichem Ausmaß. Dies macht eine eindeutige pharmakologische Abgrenzung des  $I_h$ -Stroms durch Cäsium unmöglich. Aus diesem Grund wurde in der Folge nach spezifischeren Kanalblockern gesucht.

### 3.1.3.4. Kanalblock durch ZD7288

**Abb. 3.7.: Chemische Struktur von ZD7288**  
Die Substanz besitzt ein Molekulargewicht von 292.8 g/mol

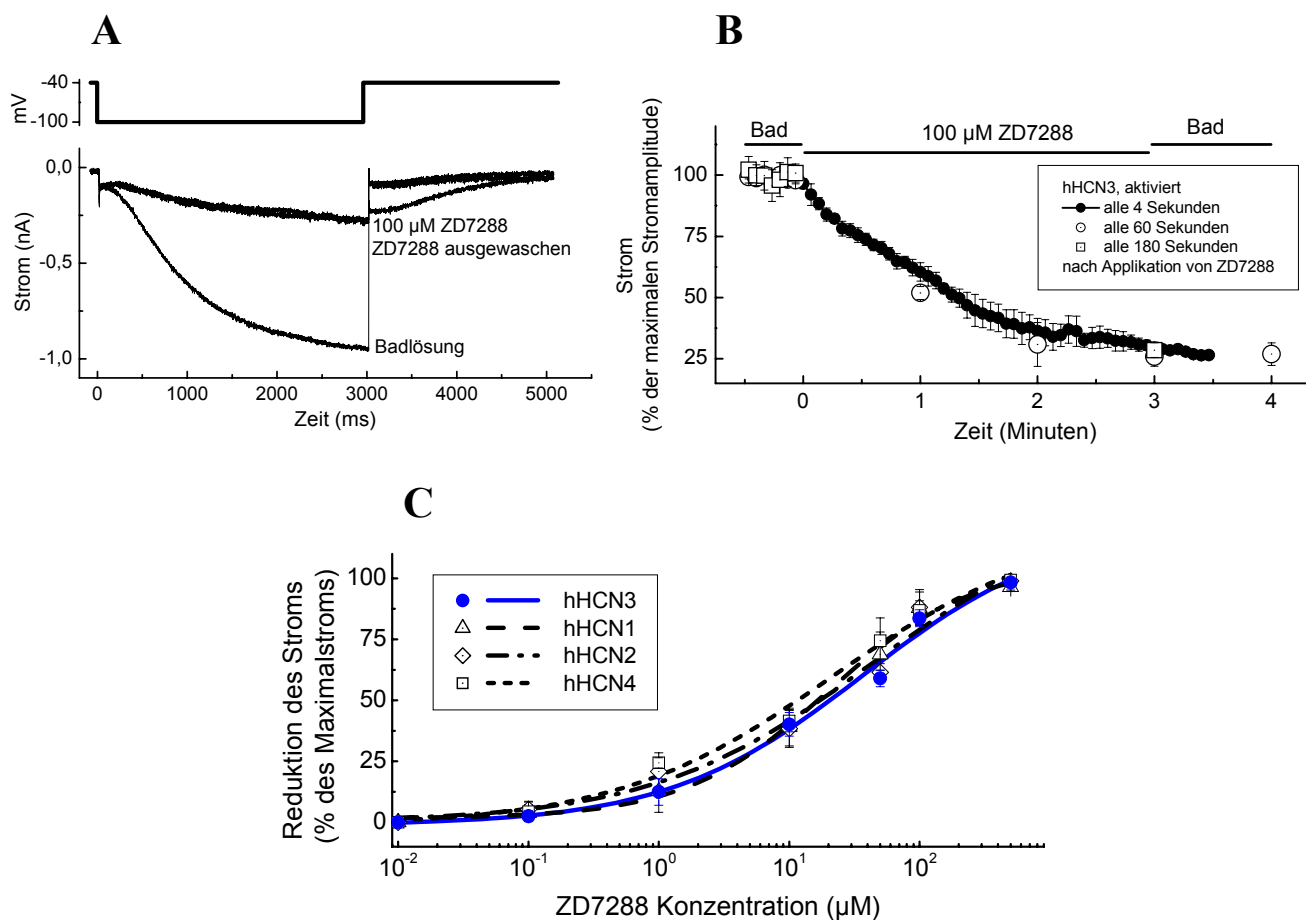


Die genannten Probleme mit Cäsium machen den Einsatz von spezifischeren und besser verträglichen HCN-Kanalblockern erforderlich. Dabei stellte die Entdeckung der blockierenden Wirkung der Substanz ZD7288 (Abb. 3.7.) auf den  $I_f$ -Strom in Sinusknotenzellen einen großen Fortschritt dar (BoSmith, 1993). Insbesondere scheint die Substanz, im Gegensatz zu Cäsiumionen, keinen Effekt auf andere Ionenkanäle z.B. in Sinusknotenzellen zu haben. ZD7288 blockiert auch klonierte, heterolog exprimierte murine HCN-Kanäle, etwa den mHCN1-Kanal (Shin et al., 2001). Abb. 3.8.C zeigt, dass neben den humanen HCN-Kanäle 1,2 und 4 auch hHCN3-Kanäle durch ZD7288 in gleichem Ausmaß geblockt werden. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in den Dosis-Wirkungskurven der einzelnen Kanäle. Die  $IC_{50}$ -Werte liegen im Bereich von 20 – 40  $\mu M$  (Abb. 3.8.C) und sind damit deutlich niedriger als die von Cäsium. ZD7288 ist also ein effizienterer Blocker als Cäsium, allerdings setzt die Wirkung deutlich langsamer ein. Der steady-state Kanalblock tritt erst 3 – 4 Minuten nach extrazellulärer Applikation in die Badlösung ein (Abb. 3.8.B). Dies beruht wahrscheinlich auf der schlechten Membrangängigkeit und dem intrazellulären Blockmechanismus der Substanz. Hierfür spricht die schnelle Blockierung des Kanals innerhalb von Sekunden bei Applikation von ZD7288 an die

Innenseite der Zellmembran im inside-out Modus der Patch-Clamp Technik (Shin et al., 2001). Der Blocker ist außerdem an der cytosolischen Seite der Zellmembran leicht auswaschbar, während dies durch extrazelluläres Waschen nicht möglich ist (Abb. 3.8.A).

Die Ergebnisse zeigen, dass hHCN3 sich in Hinsicht auf seine Blockierbarkeit durch Cäsiumionen und ZD7288 nicht von den anderen hHCN-Isoformen unterscheidet.

Inzwischen wurden eine Reihe weiterer  $I_h$ -Blocker entwickelt, die spezifisch die Herzfrequenz senken und teilweise auch schon als Medikament zugelassen sind. Als Beispiel ist hier Ivabradin (Procoralan<sup>®</sup>) für die Indikation stabile Angina pectoris zu nennen.



**Abb. 3.8.: Kanalblock durch ZD7288**

(A) Beispielstrom für hHCN3 vor und nach Applikation von 100  $\mu$ M ZD7288. Nach dreiminütiger Applikation von ZD7288 ist der steady-state Block erreicht. Durch anschließendes Einwaschen von normaler Badlösung lässt sich der Kanalblock nicht aufheben.

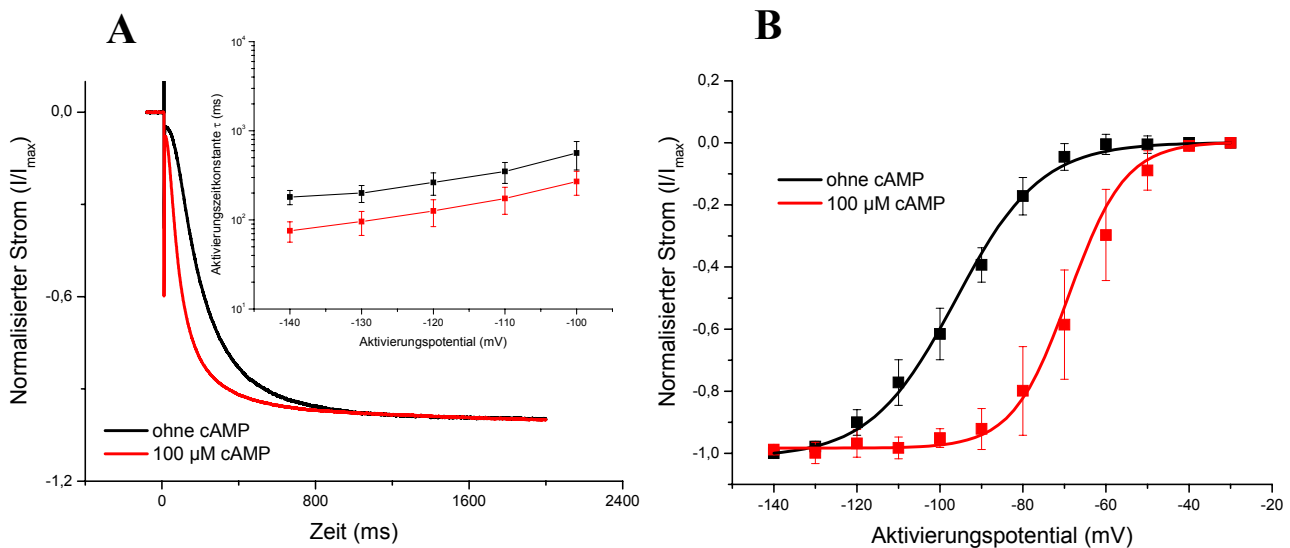
(B) Zeitverlauf der Blockade von hHCN3 durch ZD7288. Der maximale Block entwickelt sich langsam und ist nach 3-4 Minuten erreicht. Das Ausmaß der Inhibition ist unabhängig von der Zahl der Kanalaktivierungen. Die maximale Wirkung wird z.B. auch durch eine einzige Aktivierung nach 3 Minuten erreicht.

(C) Dosis-Wirkungskurven für den Block durch ZD7288 für alle 4 hHCN-Subtypen. Die Linien stellen einen Boltzmann-Fit der Mittelwerte dar. Es zeigt sich keine signifikanten Unterschiede in den  $IC_{50}$ -Werten zwischen den Kanal-Isoformen. Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben,  $n = 8$  Zellen/Kanal.

### 3.1.3.5. Modulation durch zyklische Nukleotide

Zyklische Nukleotide (cAMP bzw. cGMP) führen bei den hHCN-Subtypen1, -2 und -4 zu einer Modulation sowohl der spannungsabhängigen Aktivierung, als auch der Aktivierungskinetik. Bei diesen Subtypen kommt es zu einer Stimulation der Kanalaktivität durch eine Aktivierung bei positiveren Potentialen und eine Beschleunigung der Aktivierungskinetik.

Wie auch bei den murinen HCN-Isoformen sprechen vor allem hHCN2 und hHCN4 sehr gut auf cAMP (100  $\mu$ M) an. Das Potential der halbmaximalen Aktivierung wird für hHCN2 um  $28.5 \pm 5.9$  mV und für hHCN4 um  $23.0 \pm 8.1$  mV in Richtung positiverer Aktivierungspotentiale verschoben. Außerdem wird die Aktivierungskinetik von hHCN2 und hHCN4 um das 2.2- bzw. 4-fache beschleunigt (Abb. 3.10.). Auch hHCN1 wird durch cAMP moduliert, allerdings fällt der Effekt hier wesentlich geringer aus. Die Aktivierungskurve ist nur um  $6.7 \pm 4$  mV nach rechts verschoben, während die Aktivierungskinetik 1.4-fach beschleunigt wird. Beide Effekte sind aber dennoch statistisch signifikant. Abb. 3.9. zeigt exemplarisch die Modulation der verschiedenen Stromparameter von hHCN2 durch cAMP.



**Abb. 3.9.: Modulation von hHCN2 durch cAMP**

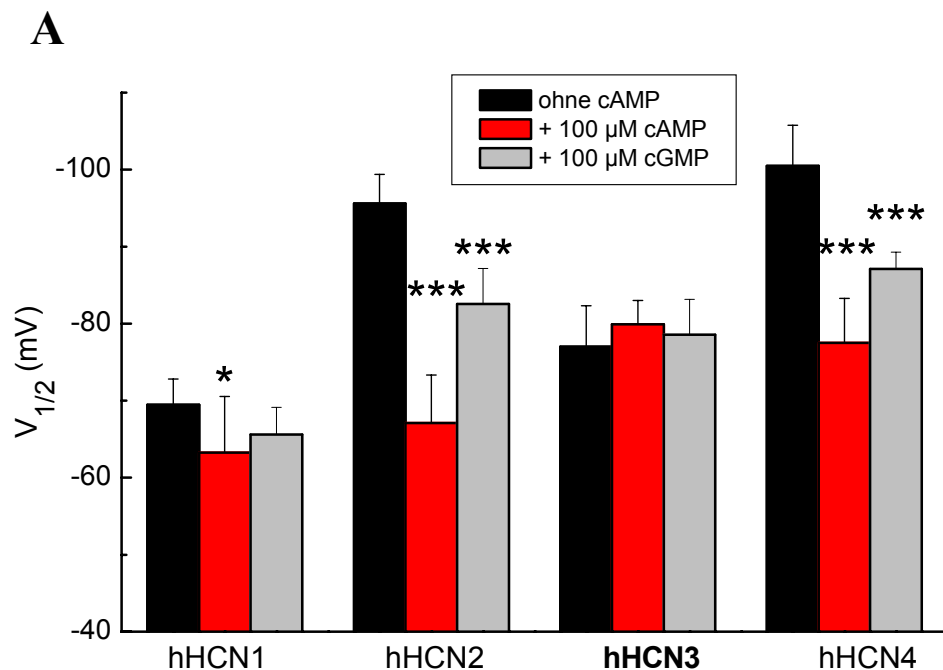
(A) Beschleunigung der Aktivierungskinetik durch 100  $\mu$ M cAMP. Nach Zugabe von cAMP wird die maximale Stromamplitude nach einem Puls auf  $-140$  mV schneller erreicht (Haltepotential:  $-40$  mV). Die eingefügte kleine Abbildung zeigt die Aktivierungskinetiken mit und ohne cAMP in Abhängigkeit vom Aktivierungspotential zwischen  $-140$  mV und  $-100$  mV.

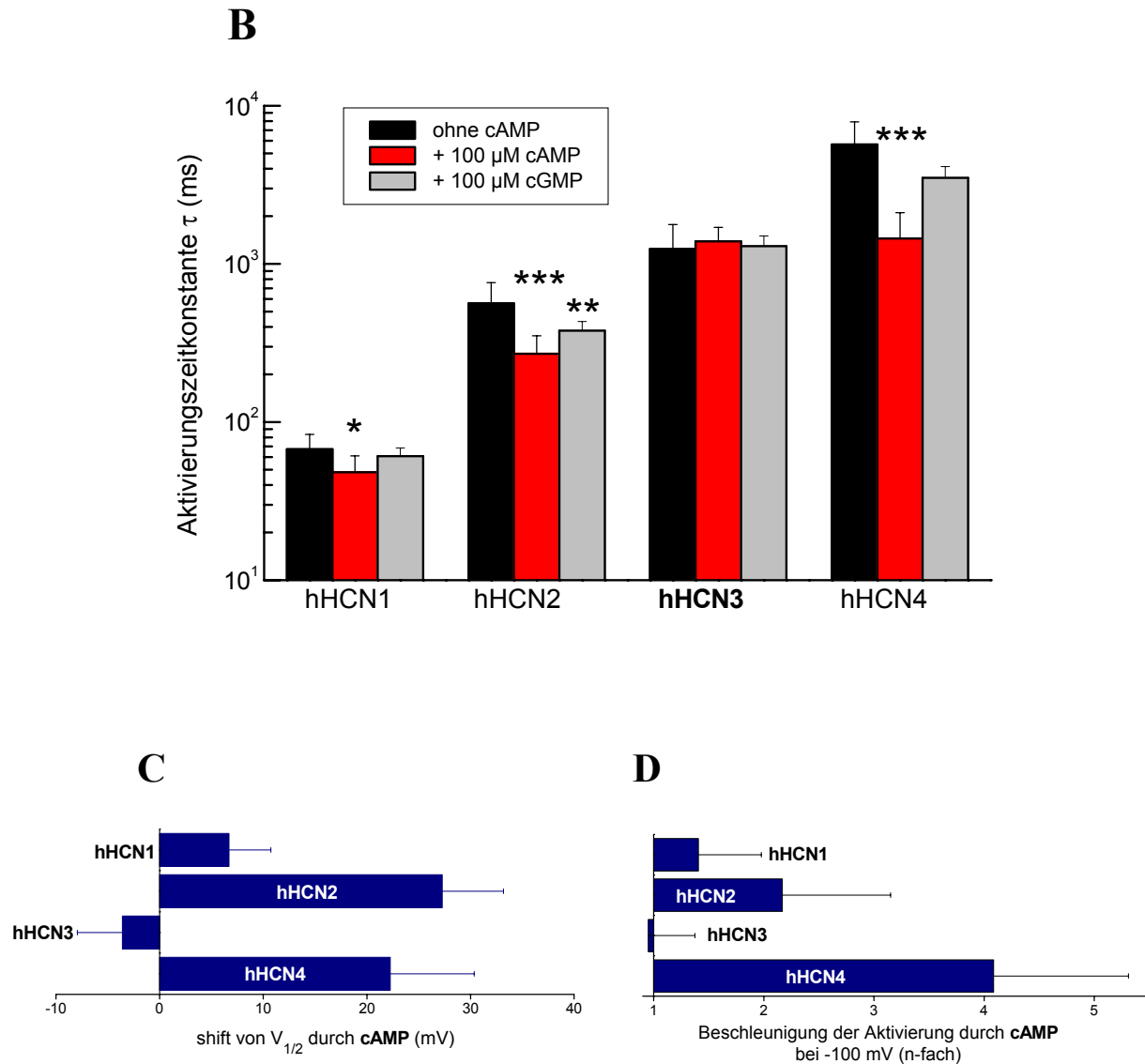
(B) Modulation der spannungsabhängigen Aktivierungskurven. Durch cAMP wird die Kurve nach rechts verschoben, d.h. der Kanal wird schon bei deutlich positiveren Membranpotentialen aktiviert. Insgesamt ist zur Kanalöffnung also weniger Energie erforderlich.

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben,  $n = 6 - 12$  Zellen/Bedingung.

Außer durch cAMP werden HCN-Kanäle auch durch cGMP in ihrer Aktivität reguliert. Allerdings ist der Effekt von cGMP bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 3.10.). Die Verschiebungen in den Aktivierungskurven zu positiveren Potentialen betragen hier  $3.9 \pm 2.1$  mV für hHCN1,  $13.1 \pm 5.1$  mV für hHCN2 und  $13.4 \pm 1.6$  mV für hHCN4. Für hHCN2 und hHCN4 ist der shift statistisch signifikant. Die Aktivierungskinetiken der 3 Subtypen werden durch cGMP ebenfalls nur schwach beeinflusst. Eine signifikante Beschleunigung der Aktivierung ist nur bei hHCN2 festzustellen.

Der entscheidende Unterschied von hHCN3 zu den anderen 3 Isoformen liegt in seiner fehlenden Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide (Abb. 3.10.). hHCN3 zeigt keine Steigerung der Kanalaktivität in Gegenwart von cAMP bzw. cGMP. Weder die spannungsabhängigen Aktivierungskurven noch die Aktivierungskinetik werden positiv beeinflusst. Tendenziell ist in der spannungsabhängigen Aktivierung sogar ein leichter, nicht signifikanter shift hin zu negativeren Aktivierungspotentialen festzustellen. Es ist also nach Zugabe von cAMP mehr Energie zur Kanalaktivierung erforderlich. Dieser Negativ-shift muss allerdings kein Effekt von cAMP sein, sondern könnte einfach auf einen sog. „run-down“, also die langsame Deaktivierung des Kanals nach längeren Messzeiträumen, zurückzuführen sein. Dieses Phänomen ist auch von den anderen HCN-Subtypen bekannt und liegt etwa in der Größenordnung des Negativ-shifts für hHCN3 nach cAMP-Applikation.





**Abb. 3.10.: Modulation der hHCN-Kanäle durch cAMP bzw. cGMP**

(A) Potential der halbmaximalen Aktivierung ( $V_{1/2}$ ) für alle humanen HCN-Kanäle. Dargestellt sind die Werte vor Zugabe der zyklischen Nukleotide (schwarz) bzw. nach Applikation von cAMP (rot) oder cGMP (grau).

(B) Aktivierungszeitkonstanten  $\tau$  für alle hHCN-Isoformen bei einem Aktivierungspotential von  $-100$  mV, sowohl vor (schwarz) als auch nach der Zugabe von cAMP (rot) bzw. cGMP (grau).

(C) Aus Abbildung (A) errechneter shift von  $V_{1/2}$  durch  $100 \mu$ M cAMP.

(D) Aus Abbildung (B) errechnete Beschleunigung der Kanalaktivierung durch  $100 \mu$ M cAMP bei einem Potential von  $-100$  mV.

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben,  $n = 12 - 20$  Zellen/Kanal und Bedingung.

Statistische Signifikanzen: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$

(jeweils mit cAMP/cGMP gegenüber Kontrolle)

Ähnlich wie für das Potential der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$  zeigt sich auch für die Aktivierungskinetik von hHCN3 eine schwache negative Modulation (Abb. 3.10.). Die Aktivierungszeitkonstante bei  $-100$  mV steigt nach Applikation von cAMP bzw. cGMP leicht an. Die Aktivierung des Kanals wird also verlangsamt, was hier wieder als normales „run-down“-Phänomen des Stromes interpretiert werden kann.

Insgesamt weist der hHCN3 also als einzige der 4 bekannten hHCN-Isoformen keine Sensitivität für zyklische Nukleotide auf, d.h. keine Modulation im Sinne einer verstärkten Kanalaktivierung. Diese fehlende Modulierbarkeit und die strukturellen Grundlagen im hHCN3-Kanal, die für dieses Verhalten verantwortlich sein könnten, sind Gegenstand des folgenden Teils dieser Arbeit. Die wichtigsten elektrophysiologischen Eigenschaften aller 4 hHCN-Isoformen sind in Tab. 3.1. zusammengefasst.

Isoform	<i>Unmoduliert</i>			<i>cAMP-moduliert</i>		
	$V_{1/2}$ (mV)	$\tau_{-100\text{mV}}$ (ms)	$E_{\text{rev}}$ (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	$\tau_{-100\text{mV}}$ (ms)	$E_{\text{rev}}$ (mV)
hHCN1:	$-69.5 \pm 3.3$	$67 \pm 16$	$-20.7 \pm 5.5$	$-63.3 \pm 7.3$	$48 \pm 13$	$-26.5 \pm 6.4$
hHCN2:	$-95.6 \pm 3.8$	$562 \pm 198$	$-19.1 \pm 5.2$	$-67.1 \pm 6.2$	$270 \pm 81$	$-20.0 \pm 4.4$
<b>hHCN3:</b>	<b><math>-77.0 \pm 5.3</math></b>	<b><math>1244 \pm 526</math></b>	<b><math>-20.5 \pm 4.5</math></b>	<b><math>-79.9 \pm 3.1</math></b>	<b><math>1390 \pm 312</math></b>	<b><math>-22.7 \pm 4.3</math></b>
hHCN4:	$-100.5 \pm 3.3$	$5686 \pm 2234$	$-20.1 \pm 4.8$	$-77.5 \pm 5.7$	$1448 \pm 659$	$-24.7 \pm 9.3$

**Tab. 3.1.: Elektrophysiologische Eigenschaften von hHCN-Kanälen**

Sämtliche Kanäle wurden in HEK293-Zellen exprimiert.  $V_{1/2}$ , Potential der halbmaximalen Kanalaktivierung;  $\tau_{-100}$ , Aktivierungszeitkonstante bei  $-100$  mV;  $E_{\text{rev}}$ , Umkehrpotential in 20 mM extrazellulärem Kalium. Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD;  $n = 12 - 20$  Zellen pro Kanal und Bedingung

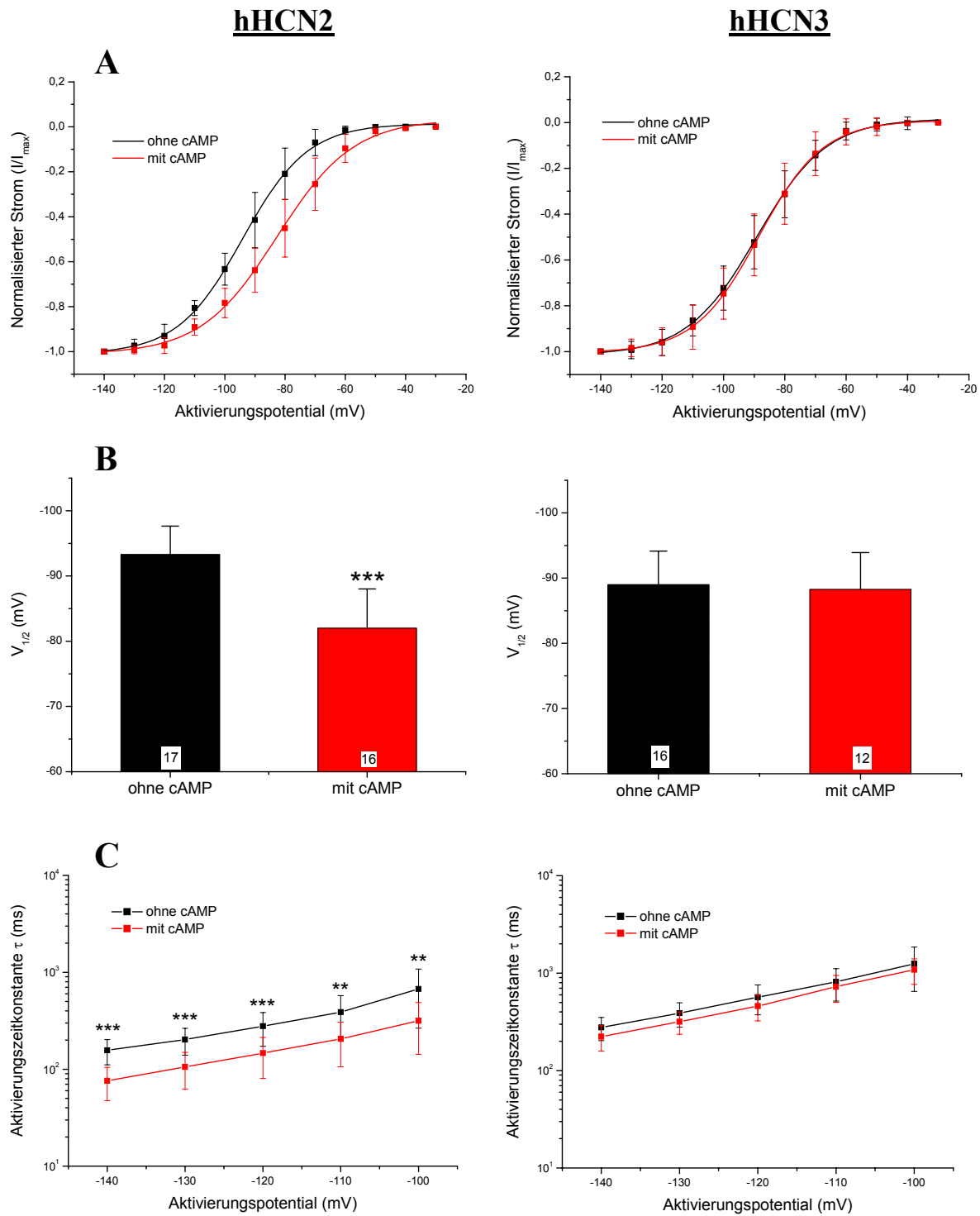
### **3.2. Molekulare Grundlagen für die fehlende cAMP-Modulierbarkeit von hHCN3**

Die im vorangegangenen Teil dargestellte Eigenschaft der fehlenden Modulierbarkeit von hHCN3 durch zyklische Nukleotide wirft die Frage nach den strukturellen molekularen Grundlagen für diesen auffälligen Unterschied zu den anderen hHCN-Kanälen auf. Sämtliche Isoformen besitzen eine ausgeprägte Homologie in ihrer Aminosäuresequenz, die sich aber in erster Linie auf die Transmembransegmente des Proteins, die sog. Kernregion, beschränkt. Die cytosolischen Teile des Kanals, also der N-Terminus und der C-Terminus weisen zum Teil erhebliche Sequenzunterschiede auf. Vor allem von der C-terminalen Region ist bekannt, dass sie wohl eine wichtige Rolle für das „Gating“ und die Modulierung durch zyklische Nukleotide spielt (Wainger et al, 2001; Johnson & Zagotta, 2005). Der C-Terminus von hHCN3 ist in seiner Länge mit dem von hHCN2 vergleichbar, der ja sehr effektiv durch zyklische Nukleotide moduliert wird. In der Folge sollen deshalb Mutationsexperimente dargestellt werden, bei denen entweder verschiedene Teile der C-terminalen Regionen dieser beiden Subtypen, oder auch nur einzelne Aminosäuren ausgetauscht wurden. Diese Mutanten bzw. Chimären wurden dann auf ihre Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide untersucht. Ziel war es dabei, die Modulierbarkeit von hHCN3 wiederherzustellen. Die Experimente wurden hierzu nur mit dem effektiveren Modulator cAMP durchgeführt.

#### **3.2.1. Kontrollexperimente mit den Wildtyp-Kanälen hHCN2 und hHCN3**

Die Messungen der Kanalmutanten wurden an einem anderen Meßstand durchgeführt als die ursprüngliche Grundcharakterisierung der Wildtyp-Kanäle aus dem vorangegangenen Teil. Wegen der evtl. veränderten Messbedingungen (klimatisierter Raum, anderes Perfusionssystem usw.) mussten zuerst Kontrollmessungen mit hHCN2 bzw. hHCN3 unter den neuen Bedingungen durchgeführt werden, um einen korrekten Vergleich mit den Kanalmutanten zu gewährleisten. Wie schon bei der Grundcharakterisierung (3.1.3.5.) war für hHCN2 eine hochsignifikante Modulierung durch cAMP festzustellen, sowohl in der spannungsabhängigen Aktivierung wie auch in der Aktivierungskinetik des Kanals, wobei die durch cAMP verursachten Effekte (shift von  $V_{1/2}$ : 12 mV) etwas geringer ausfielen. Wie zu erwarten, wurde hHCN3 nicht durch cAMP moduliert (Abb. 3.11.). Die Ergebnisse aus der Grundcharakterisierung waren also auch unter den neuen Bedingungen reproduzierbar.





**Abb. 3.11.: Kontrollmessungen mit Wipac-Kanälen hHCN2 und hHCN3**

(A) Aktivierungskurven von hHCN2 (links) und hHCN3 (rechts) in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart (rot) von 100  $\mu$ M cAMP.

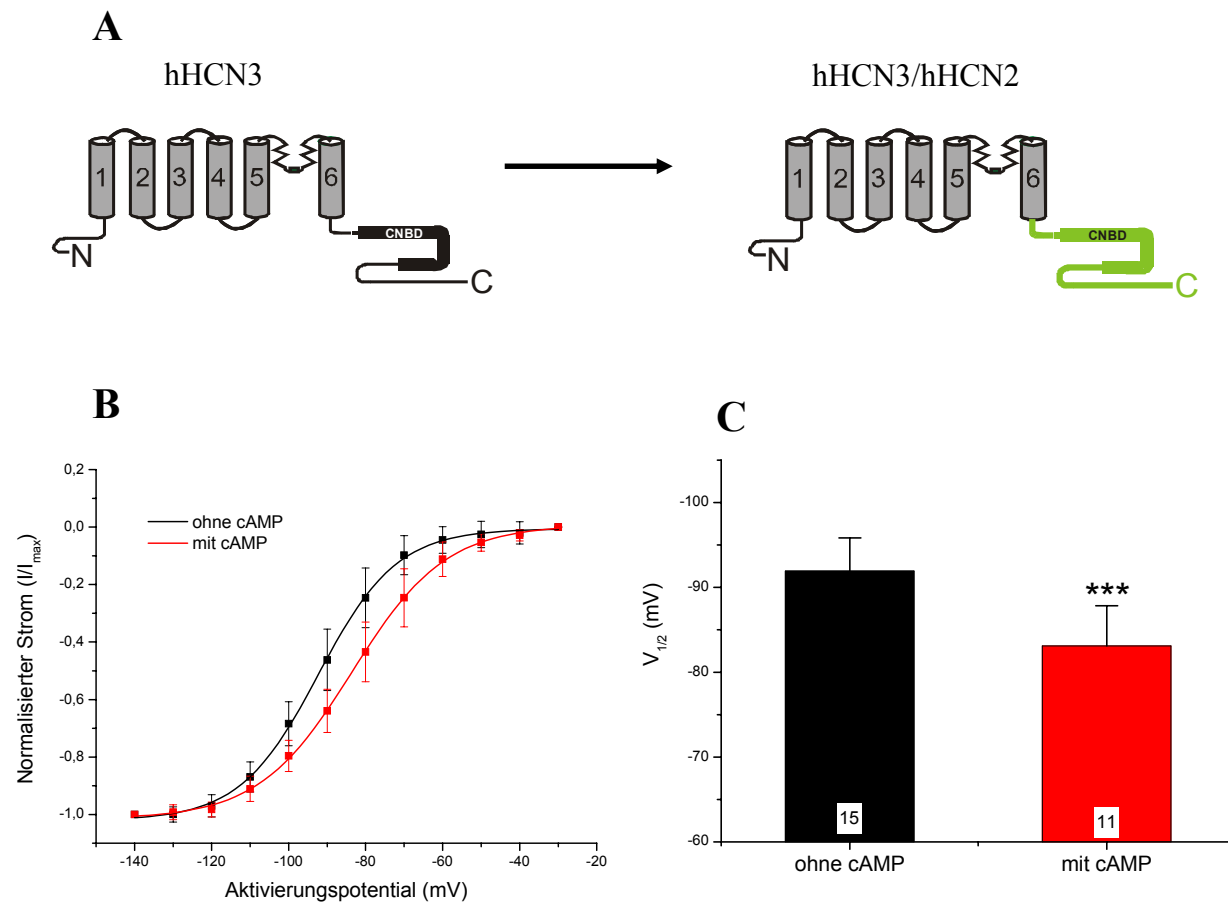
(B) Modulation der spannungsabhängigen Aktivierung. Gezeigt ist die statistische Auswertung des shifts von  $V_{1/2}$  in Gegenwart von cAMP. Die n-Zahlen sind unten in den Säulen angegeben.

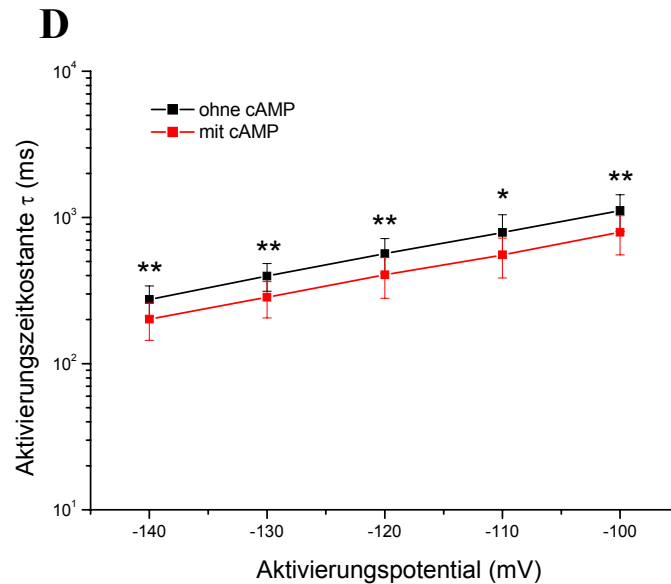
(C) Modulation der Aktivierungsgeschwindigkeit durch cAMP. Die Ordinate ist logarithmisch skaliert. Statistische Signifikanzen: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (jeweils cAMP gegenüber Kontrolle). Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD;  $n = 12 - 17$  Zellen pro Kanal und Bedingung.

$V_{1/2}$  und die Aktivierungszeitkonstanten für beide Kanäle lagen im Bereich der Resultate aus der Grundcharakterisierung im ersten Teil dieser Arbeit (3.1.3.1.).

### 3.2.2. Austausch des gesamten C-Terminus zwischen hHCN2 und hHCN3

Als erste Mutation wurde die gesamte C-terminale Region von hHCN3 gegen die des durch cAMP modulierbaren hHCN2 ausgetauscht (Abb. 3.12.A), um den Einfluss dieses Kanalteils zu untersuchen. Der resultierende chimäre Kanal ist durch 100  $\mu$ M cAMP sowohl in der spannungsabhängigen Aktivierung mit einem shift in  $V_{1/2}$  von 10 mV (Abb. 3.12.B,C), als auch in der Aktivierungskinetik (Abb. 3.12.D) wieder positiv modulierbar.





**Abb. 3.12.: Austausch des gesamten C-Terminus von hHCN3**

(A) Schematische Darstellung des mutierten hHCN3-Kanals. In der Mutante ist der komplette C-Terminus von hHCN2 (grün gekennzeichnet) eingefügt.

(B) Spannungsabhängige Aktivierungskurven des chimären Kanals ohne cAMP (schwarz) und in Gegenwart von 100  $\mu$ M cAMP (rot).

(C) Statistische Auswertung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$ .

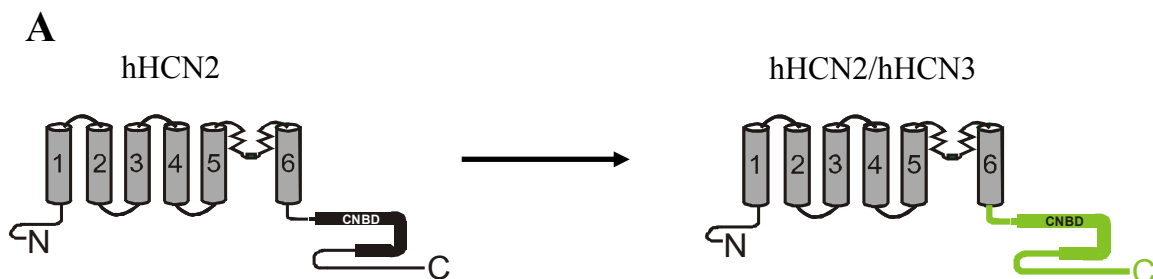
(D) Modulation der Aktivierungsgeschwindigkeit durch 100  $\mu$ M cAMP.

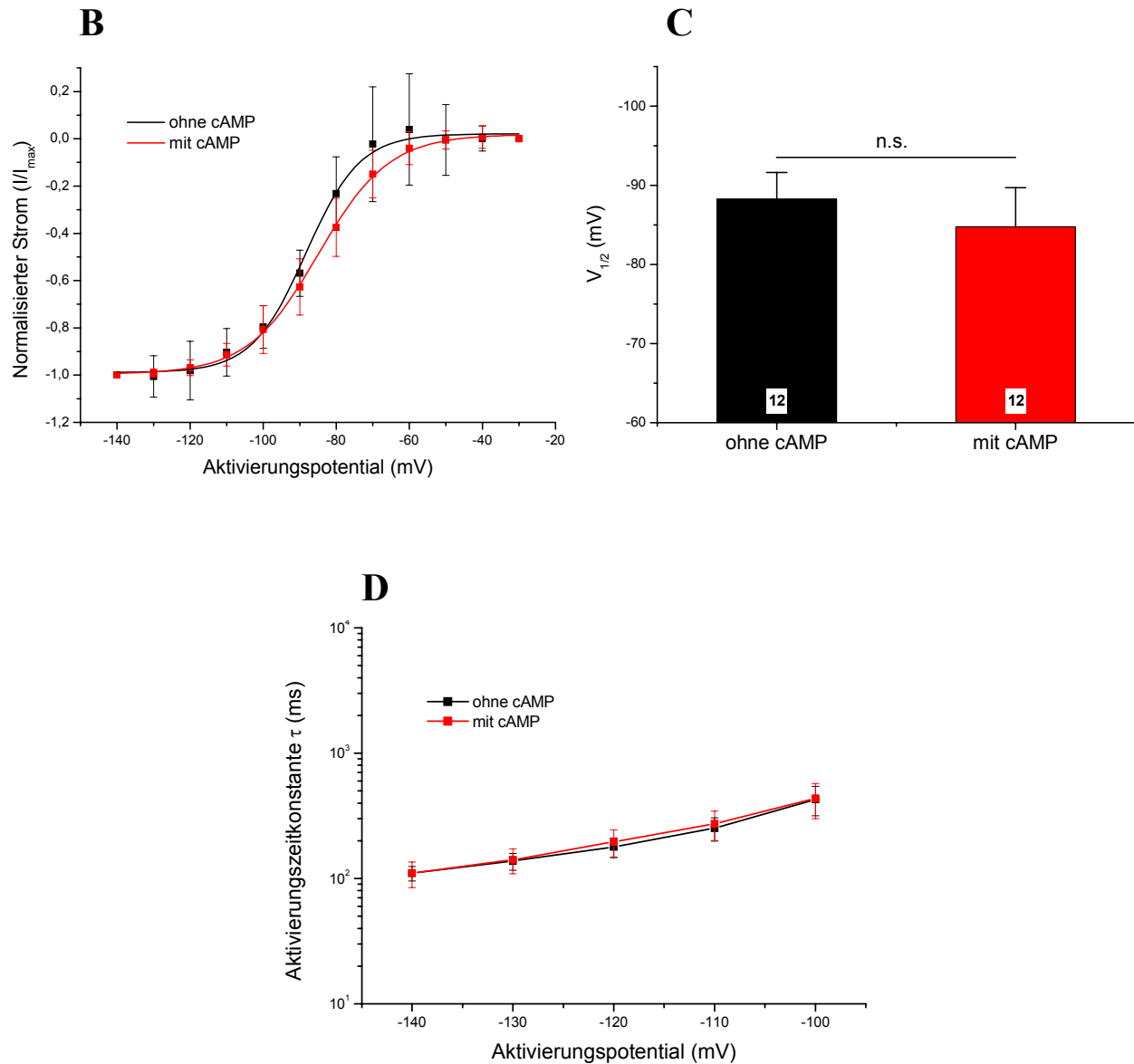
Statistische Signifikanzen: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (jeweils cAMP gegenüber Kontrolle)

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD;

n = 11 – 15 Zellen pro Bedingung.

Auch die umgekehrte Mutante, also der Austausch des kompletten C-Terminus von hHCN2 gegen den von hHCN3 (Abb. 3.13.A) zeigt einen ausgeprägten Effekt auf die Kanaleigenschaften. Der mutierte Kanal zeigt keine Modulierbarkeit durch cAMP mehr, d.h. der ursprünglich gut auf cAMP ansprechende hHCN2 wird nach Einführen des C-Terminus von hHCN3 in einen nicht mehr modulierbaren Kanal mit den Eigenschaften von hHCN3 überführt (Abb. 3.13.B,C,D).





### Abb. 3.13.: Austausch des gesamten C-Terminus von hHCN2

(A) Schematische Darstellung des mutierten hHCN2-Kanals. In der Mutante ist der komplette C-Terminus von hHCN3 (grün gekennzeichnet) eingefügt.

(B) Spannungsabhängige Aktivierungskurven des chimären Kanals ohne cAMP (schwarz) und in Gegenwart von 100  $\mu$ M cAMP (rot).

(C) Statistische Auswertung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$ ; n.s., statistisch nicht signifikant

(D) Modulation der Aktivierungsgeschwindigkeit durch 100  $\mu$ M cAMP.

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD;

n = 12 Zellen pro Bedingung.

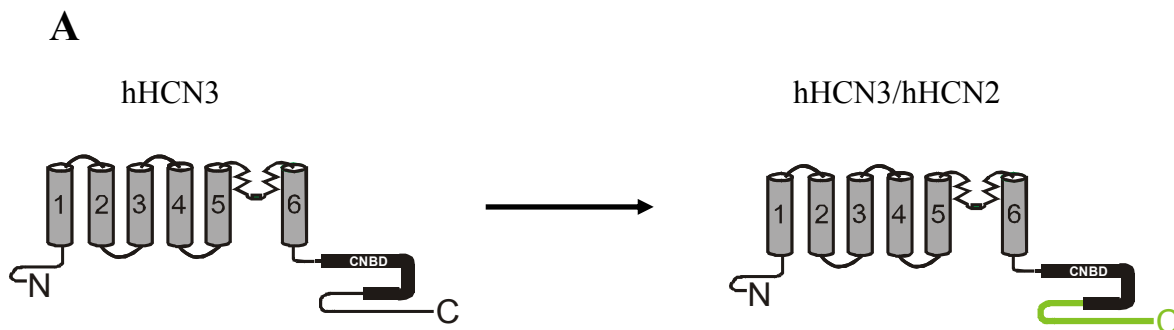
Die Ergebnisse aus den Messungen der beiden Mutanten unterstreichen die entscheidende Rolle eines kompletten, funktionellen C-Terminus für die cAMP-abhängige Kanalaktivierung bei beiden hHCN-Isoformen.

Um den Einfluss des C-Terminus auf die fehlende Modulierbarkeit von hHCN3 durch cAMP noch detaillierter aufzuklären, wurden in der Folge einzelne Teile des C-Terminus zwischen hHCN2 und hHCN3 ausgetauscht und die Auswirkungen auf das Kanal-Gating betrachtet.

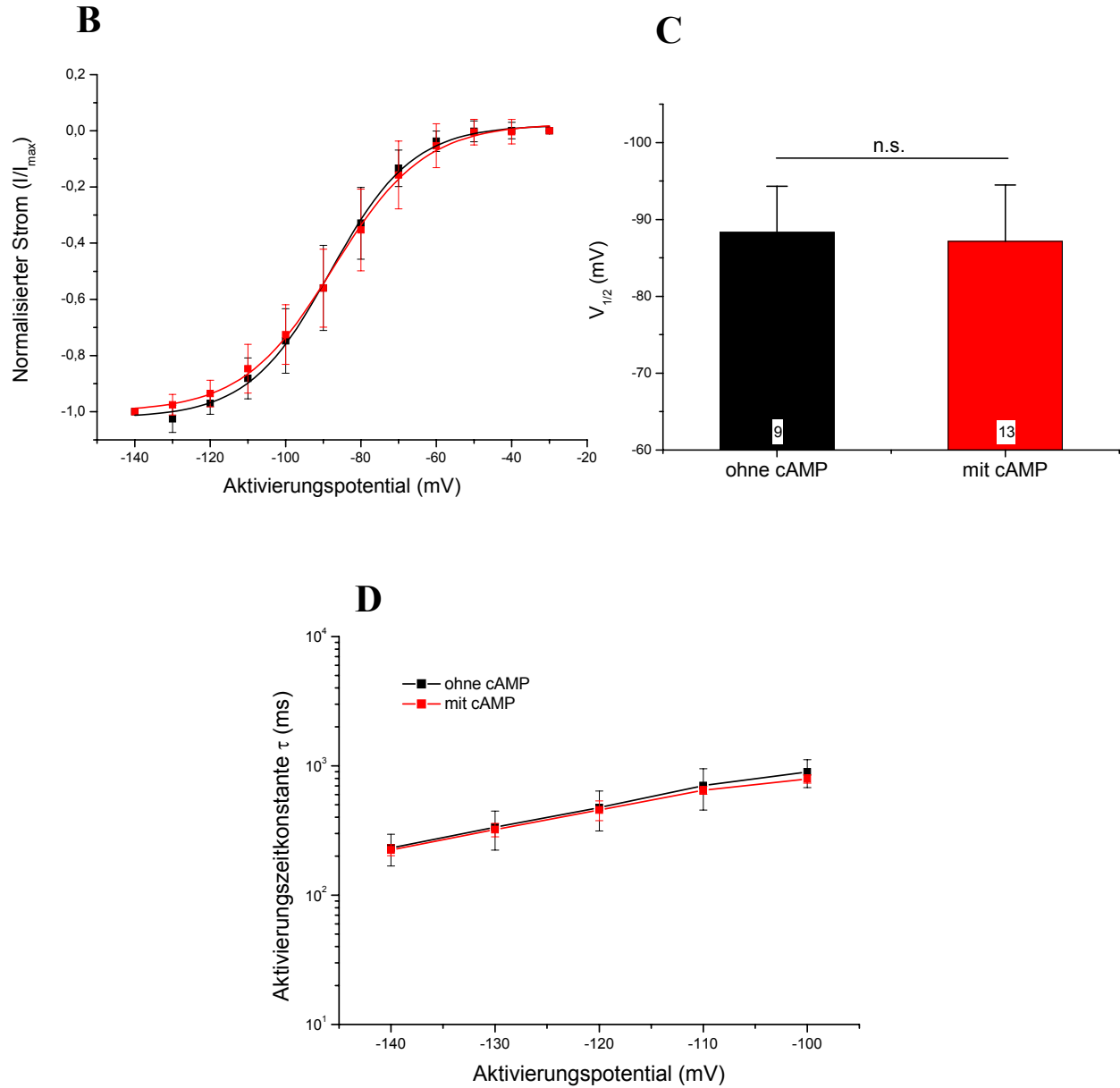
### 3.2.3. Austausch des extremen C-Terminus zwischen hHCN2 und hHCN3

Nach der Bindungsdomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) schließt sich der sogenannte „extreme“ C-Terminus des Proteins an (Abb. 3.14.A). Diese äußerste C-terminale Region ist bei hHCN2 und hHCN3 etwa gleich lang (~ 220 Aminosäuren) und weist zwischen allen hHCN-Subtypen teilweise erhebliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf. Er könnte zumindest teilweise an der basalen (ohne Einfluss von cAMP) Inhibierung der Kanalpore und damit auch an der Wirkung von cAMP mitbeteiligt sein. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden zwei Chimären hergestellt, bei denen jeweils der extreme C-Terminus durch den des anderen Kanals ausgetauscht wurde.

Als Erstes wurde eine entsprechende Mutante von hHCN3 hergestellt (Abb. 3.14.A).



Das Einführen des extremen C-Terminus von hHCN2 in hHCN3 führte nicht zu einer Wiederherstellung der Modulierbarkeit durch cAMP. Weder die spannungsabhängige Aktivierung (Abb. 3.14.B,C), noch die Aktivierungsgeschwindigkeit (Abb. 3.14.D) wurden signifikant beeinflusst. Dieser chimäre Kanal zeigt also die Eigenschaften eines reinen Wildtyp-hHCN3-Kanals. Die fehlende Modulierbarkeit des hHCN3-Kanals ist demnach nicht allein auf einen „fehlerhaften“ extremen C-Terminus zurückzuführen, sondern (zusätzlich) auf andere Strukturen innerhalb der kompletten C-terminalen Region von hHCN3.



**Abb. 3.14.: Austausch des extremen C-Terminus von hHCN3**

(A) Schematische Darstellung des mutierten hHCN3-Kanals. In der Mutante ist der extreme C-Terminus von hHCN2 (grün gekennzeichnet) eingefügt.

(B) Spannungsabhängige Aktivierungskurven des chimären Kanals ohne cAMP (schwarz) und in Gegenwart von 100  $\mu$ M cAMP (rot).

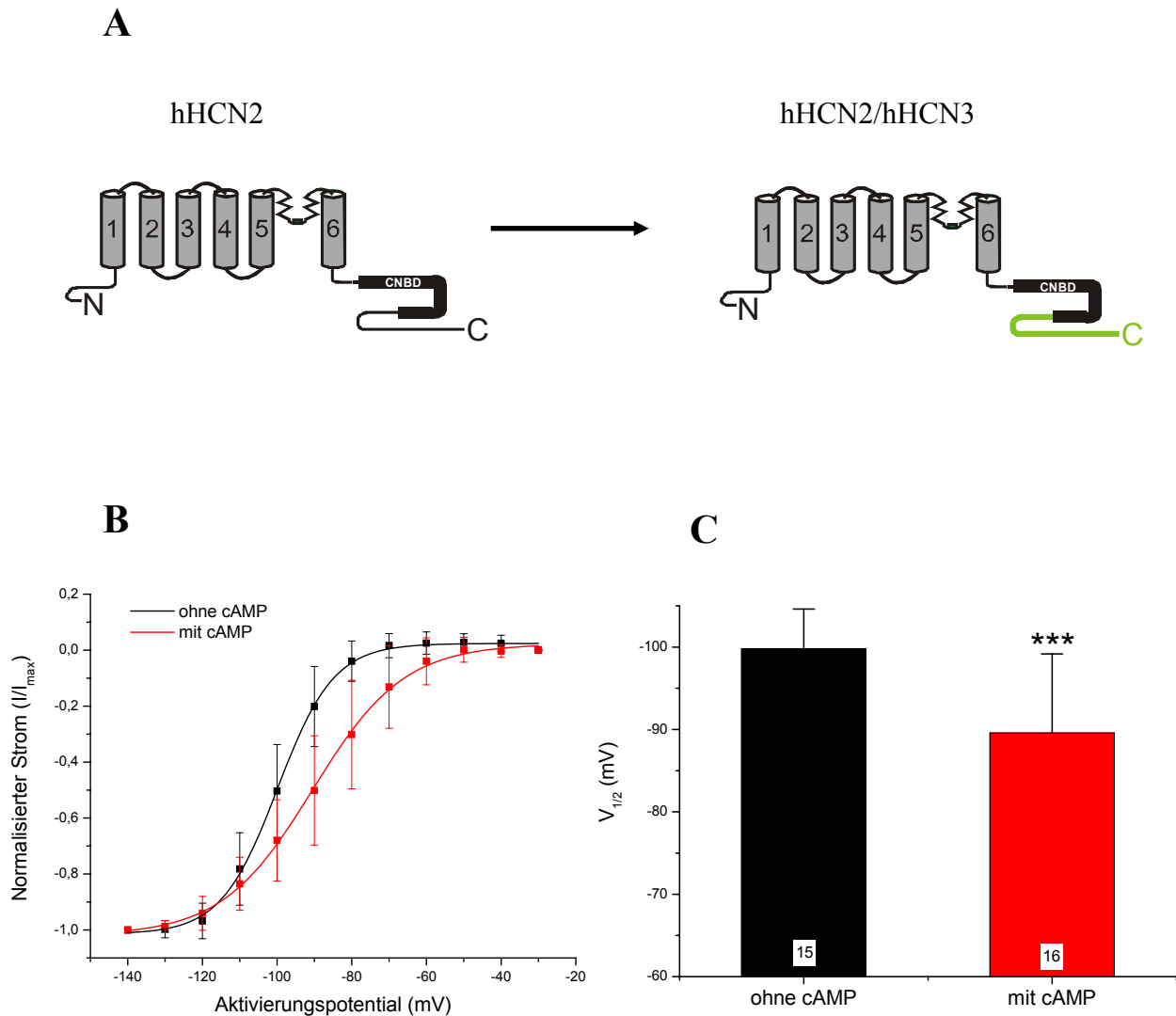
(C) Statistische Auswertung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$ ; n.s., statistisch nicht signifikant

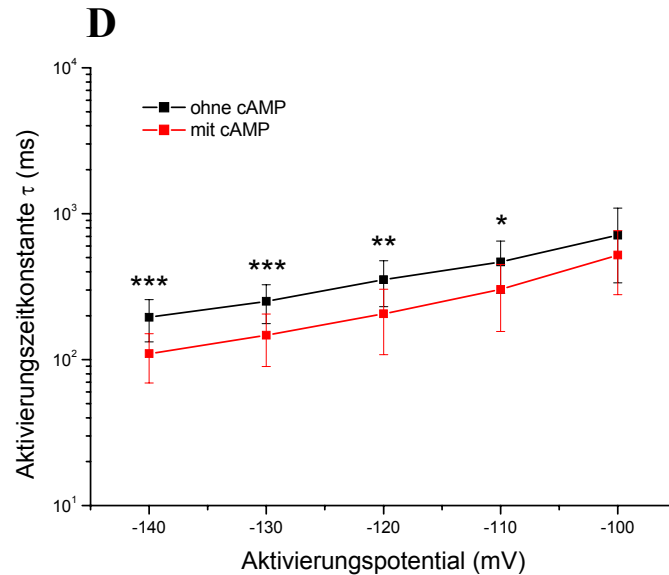
(D) Modulation der Aktivierungsgeschwindigkeit durch 100  $\mu$ M cAMP.

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD;

n = 9 – 13 Zellen pro Bedingung.

Auch die umgekehrte Mutante, nämlich das Einführen des extremen C-Terminus von hHCN3 in hHCN2 (Abb. 3.15.A), spiegelt die ursprünglichen Eigenschaften des Wildtyp-hHCN2-Kanals wider. Durch die Mutation ändern sich die Eigenschaften in Hinsicht auf die Modulierbarkeit nicht. cAMP verursacht in dieser Chimäre einen signifikanten shift von 10 mV hin zu positiveren Aktivierungspotentialen (Abb. 3.15.B,C) und eine signifikante Beschleunigung der Aktivierungskinetik (Abb. 3.15.D). Dieses Ergebnis bestätigt noch einmal, dass der extreme C-Terminus nicht alleinverantwortlich für die Regulation der jeweiligen hHCN-Isoform durch cAMP ist, sondern dass hier auch CNBD und C-Linker-Region entscheidend eingreifen.





**Abb. 3.15.: Austausch des extremen C-Terminus von hHCN2**

(A) Schematische Darstellung des mutierten hHCN2-Kanals. In der Mutante ist der extreme C-Terminus von hHCN3 (grün gekennzeichnet) eingefügt.

(B) Spannungsabhängige Aktivierungskurven des chimären Kanals ohne cAMP (schwarz) und in Gegenwart von 100  $\mu$ M cAMP (rot).

(C) Statistische Auswertung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$

(D) Modulation der Aktivierungsgeschwindigkeit durch 100  $\mu$ M cAMP.

Statistische Signifikanzen: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (jeweils cAMP gegenüber Kontrolle)

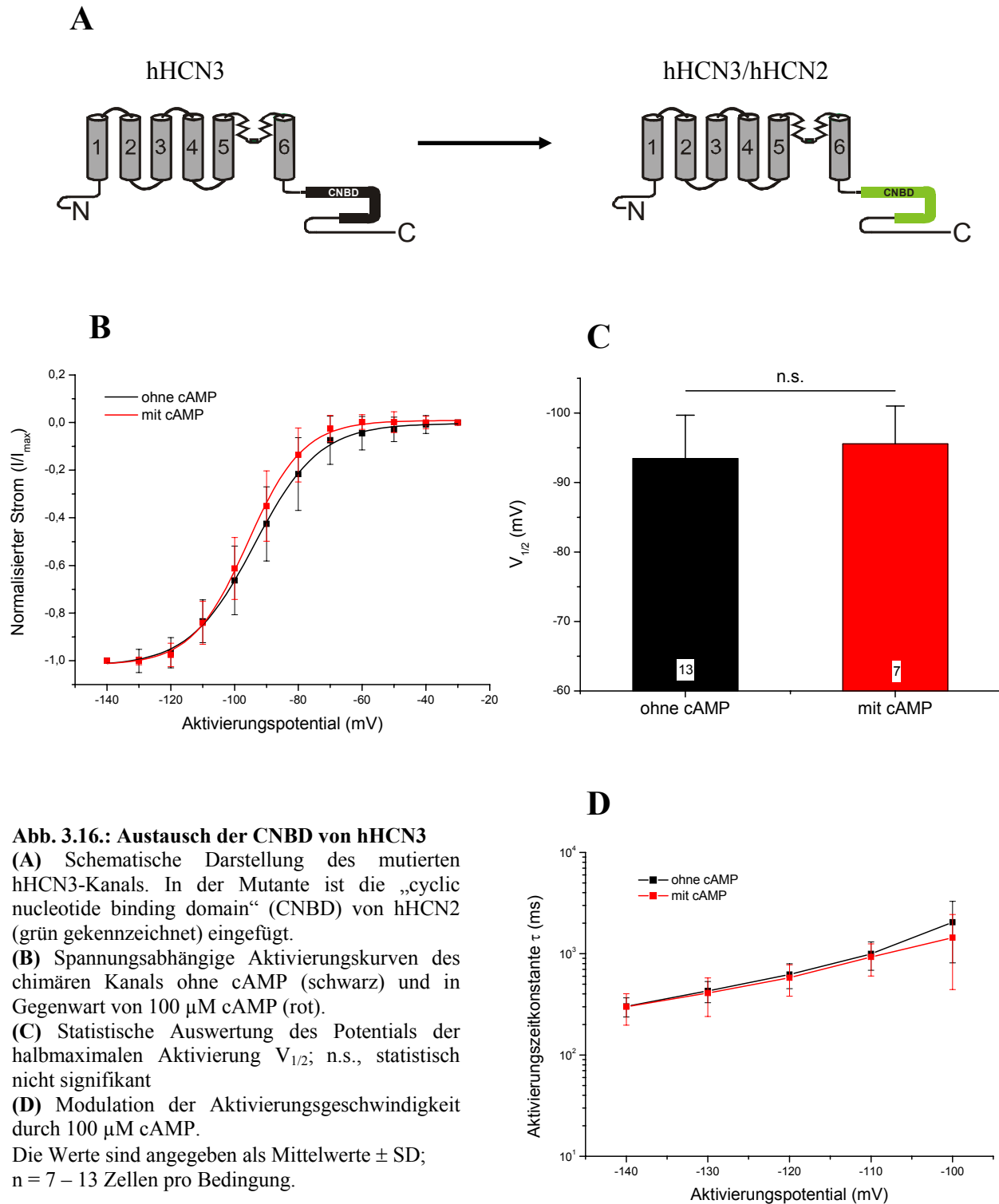
Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD;

$n = 12 - 16$  Zellen pro Bedingung.

### 3.2.4. Austausch der Bindedomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) zwischen hHCN2 und hHCN3

Als nächster Teil des C-Terminus von hHCN3 wurde die sog. CNBD betrachtet. Diese Domäne ist für die eigentliche Bindung von zyklischen Nukleotiden verantwortlich und enthält auch im hHCN3 die für diese Bindung als wichtig befundene Aminosäuren (Zagotta et al., 2003; Abb. 3.19.). Dies spricht dafür, dass zyklische Nukleotide tatsächlich gebunden werden, aber möglicherweise andere differierende Teile der CNBD zwischen den einzelnen hHCN-Isoformen für die fehlende Modulierbarkeit von hHCN3 entscheidend sind. Aus diesem Grund wurde eine Austauschmutante hergestellt, bei der die CNBD von hHCN3 durch die von hHCN2 ersetzt wurde (Abb. 3.16.A). Sollte also diese Domäne neben der Nukleotidbindung auch für die fehlende Regulation verantwortlich sein, wäre durch den Austausch gegen die Domäne eines modulierbaren Kanals eine Wiederherstellung der cAMP-Sensitivität zu erwarten.

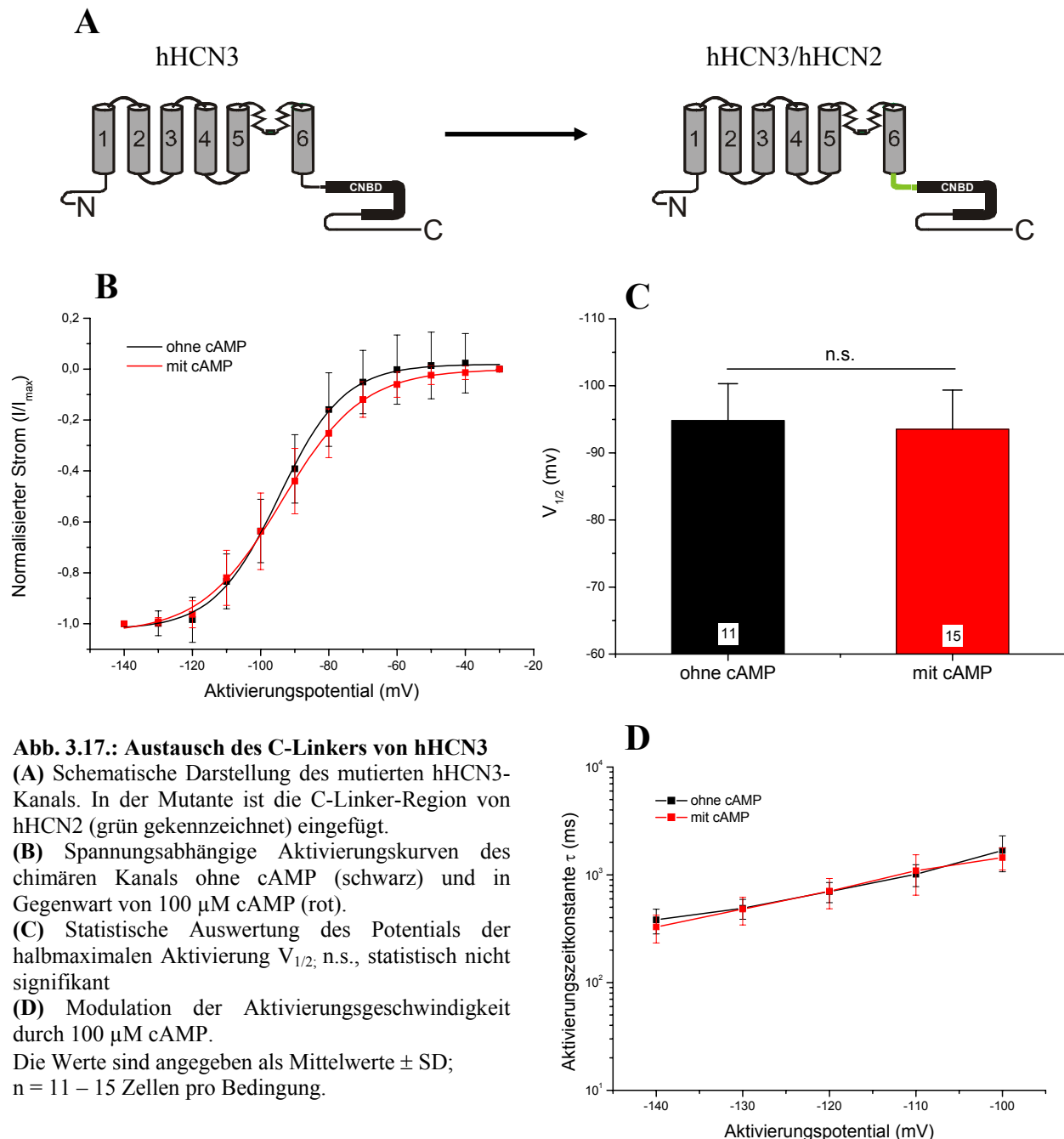




Wie aus den Abbildungen 3.16.B-D zu entnehmen ist, verursacht cAMP in dieser Mutante keine signifikanten Effekte auf die Kanalaktivität. Daraus lässt sich schließen, dass punktuelle Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen den CNBDs von hHCN2 und hHCN3 nicht die alleinige Ursache für das unterschiedliche Ansprechen auf cAMP sein können.

### 3.2.5. Austausch der C-Linker-Region zwischen hHCN2 und hHCN3

Als letzter Abschnitt des C-Terminus wurde der C-Linker untersucht. Diese relativ kurze Region des Proteins (~ 80 Aminosäuren) verbindet das Transmembransegment S6 mit der CNBD und scheint nach neueren Röntgenstrukturanalysen zumindest im mHCN2-Kanal einen entscheidenden Einfluss auf das cAMP-abhängige Gating auszuüben (Zagotta et al, 2003; Johnson & Zagotta, 2005). Um die Bedeutung der C-Linker-Region für die Regulation von hHCN3 zu klären, wurde dieses Teilstück in der folgenden Mutante gegen den C-Linker von hHCN2 ausgetauscht (Abb. 3.17.A).



**Abb. 3.17.: Austausch des C-Linkers von hHCN3**

(A) Schematische Darstellung des mutierten hHCN3-Kanals. In der Mutante ist die C-Linker-Region von hHCN2 (grün gekennzeichnet) eingefügt.

(B) Spannungsabhängige Aktivierungskurven des chimären Kanals ohne cAMP (schwarz) und in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  cAMP (rot).

(C) Statistische Auswertung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$ ; n.s., statistisch nicht signifikant

(D) Modulation der Aktivierungsgeschwindigkeit durch 100  $\mu\text{M}$  cAMP.

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD; n = 11 – 15 Zellen pro Bedingung.

Die basalen elektrophysiologischen Eigenschaften dieser Mutante weisen große Ähnlichkeiten mit der CNBD-Austauschmutante auf.  $V_{1/2}$  ohne cAMP liegt bei beiden Chimären im Bereich von etwa  $-95$  mV, die Aktivierungszeitkonstante bei einem Potential von  $-140$  mV bei etwa  $300 - 350$  ms (Abb. 3.16 und 3.17). Wie schon bei der CNBD-Mutante ist kein signifikanter Effekt von cAMP festzustellen (Abb. 3.17.), d.h. auch der C-Linker stellt nicht die „fehlerhafte“ Region im hHCN3 dar, durch die sich die fehlende Modulierbarkeit dieser Isoform erklären lässt.

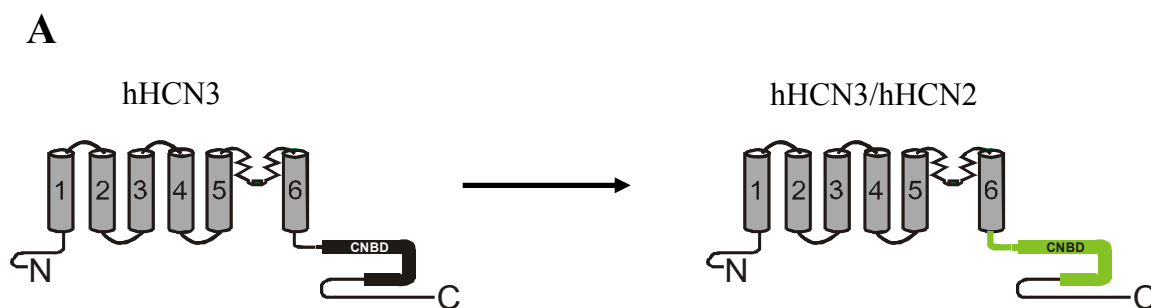
Da durch den Austausch des gesamten C-Terminus die Sensitivität von hHCN3 gegenüber cAMP wiederhergestellt werden kann (Abb. 3.12.), durch das Einbringen einzelner funktioneller Teile der c-terminalen Region aber nicht, lässt dies auf ein Zusammenwirken einzelner Regionen des C-Terminus bei der Kanalaktivierung durch cAMP schließen.

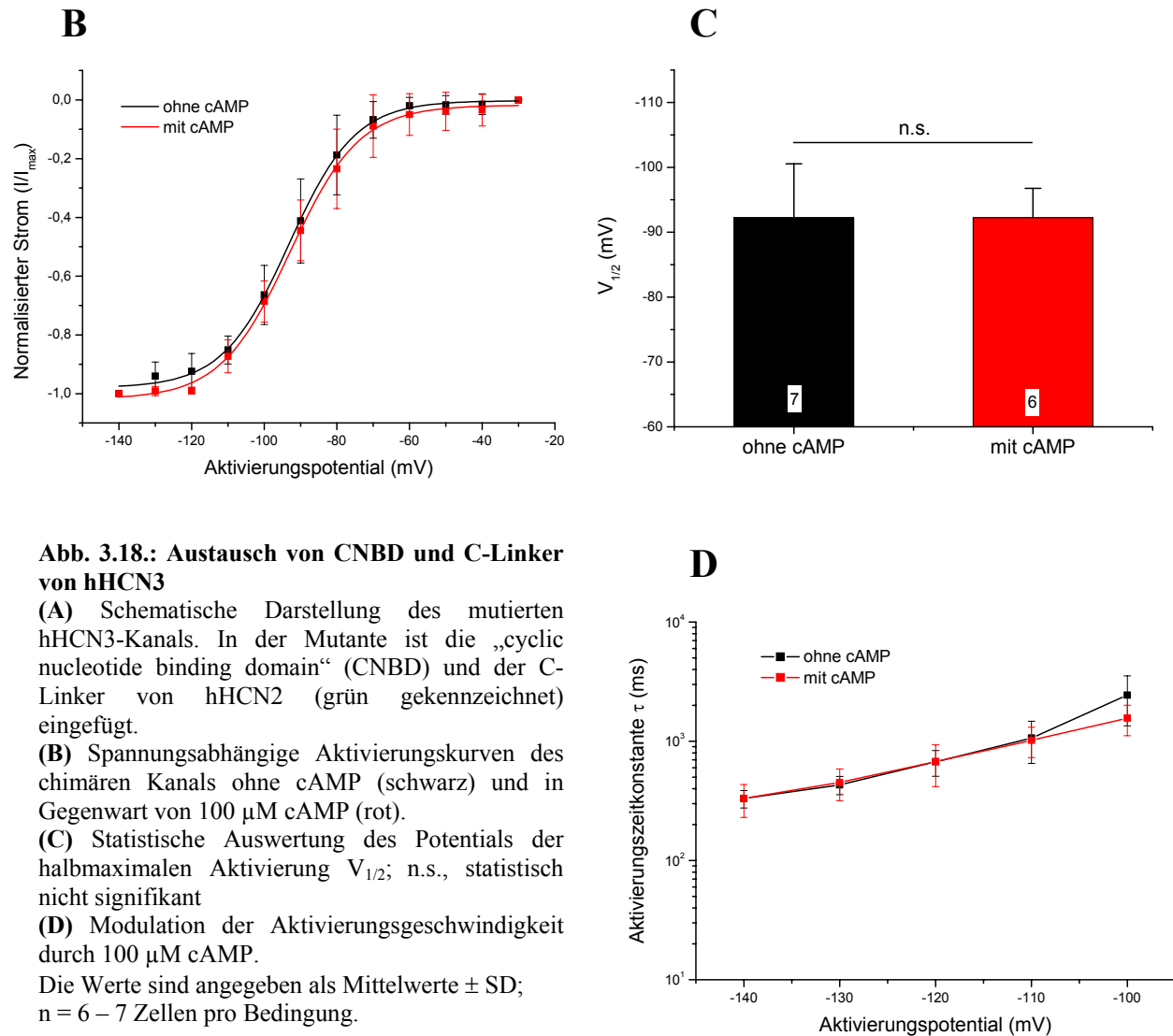
### 3.2.6. Austausch von C-Linker und CNBD zwischen hHCN2 und hHCN3

Wie schon erwähnt, wurde durch Untersuchungen an einer Kristallstruktur eines murinen HCN2-Fragments die Interaktion zwischen C-Linker und CNBD als entscheidend für die Modulation erkannt. Zusätzlich kommt es nach Bindung von cAMP zu einer Wechselwirkung der C-Linker-Regionen der einzelnen Monomere eines funktionellen tetrameren Kanals. Die Analyse dieser Kristallstruktur erlaubte allerdings auch nur Aussagen über eine begrenzte Kanalregion, da z.B. der extreme C-Terminus und die Transmembrandomänen nicht in dem kristallisierten Proteinfolekt enthalten waren.

Auch Mutagenese-Studien zwischen den murinen Subtypen mHCN1 und mHCN2 zeigen, dass C-Linker und CNBD erst durch ihre Interaktion die Modulation durch zyklische Nukleotide ermöglichen (Wang et al., 2001).

Um dieses Modell auch für hHCN3 zu untersuchen, wurde eine Mutante erzeugt, bei der C-Linker und CNBD durch die entsprechenden Regionen von hHCN2 ersetzt wurden (Abb. 3.18.A).





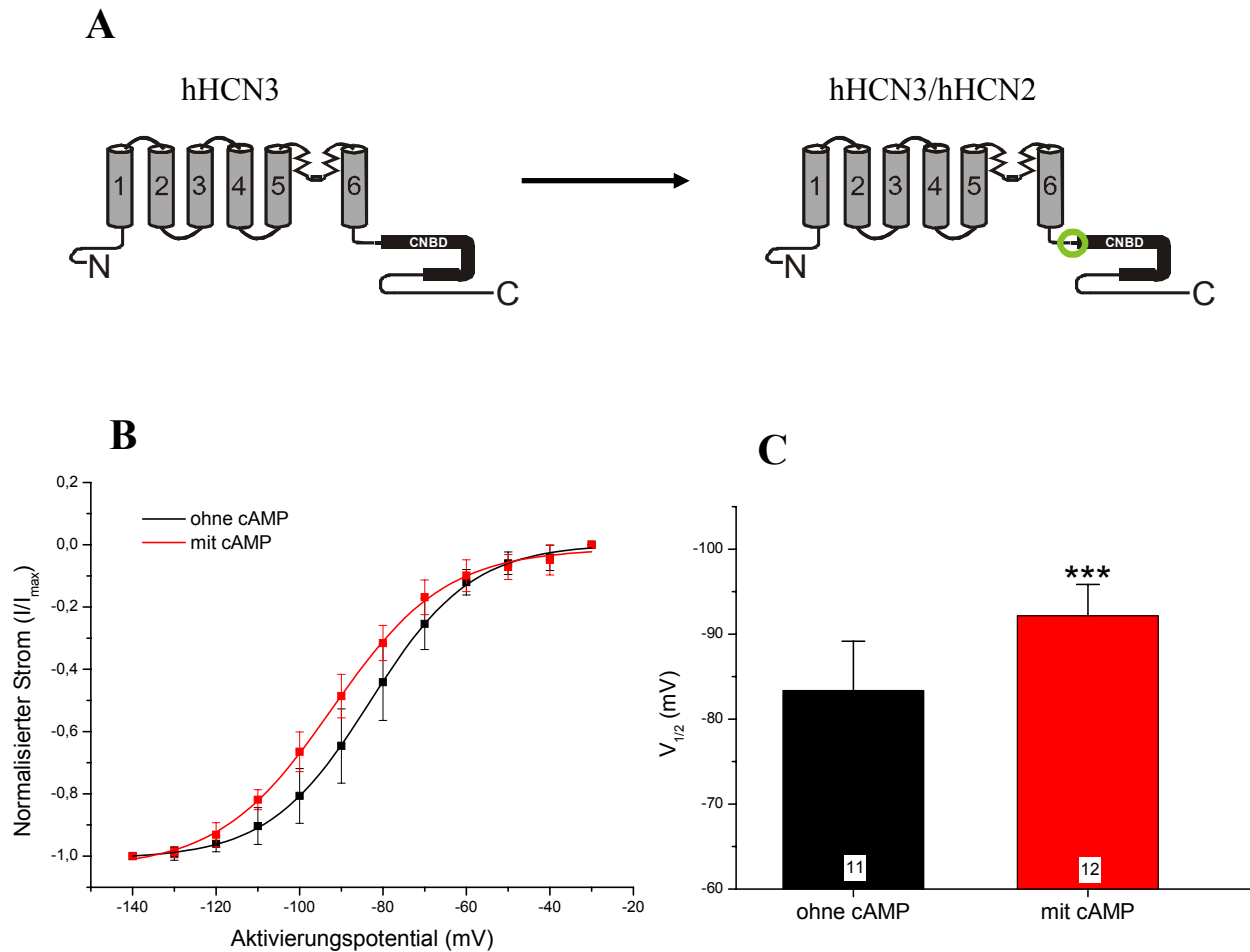
Auch der gemeinsame Austausch von C-Linker und CNBD führt nicht zur Modulierbarkeit der Mutante durch cAMP (Abb. 3.18.B-D). Es spricht also alles dafür, dass nach Austausch des gesamten C-Terminus gegen den funktionellen C-Terminus von hHCN2 alle Teilabschnitte dieser Region an der Modulation von hHCN3 durch cAMP beteiligt sind. Im Wildtyp-hHCN3 scheinen daher mehrere, über den gesamten C-Terminus verteilte Unterschiede in der Aminosäuresequenz vorzuliegen, die die zur Modulation notwendigen Konformationsänderungen des C-Terminus verhindern.

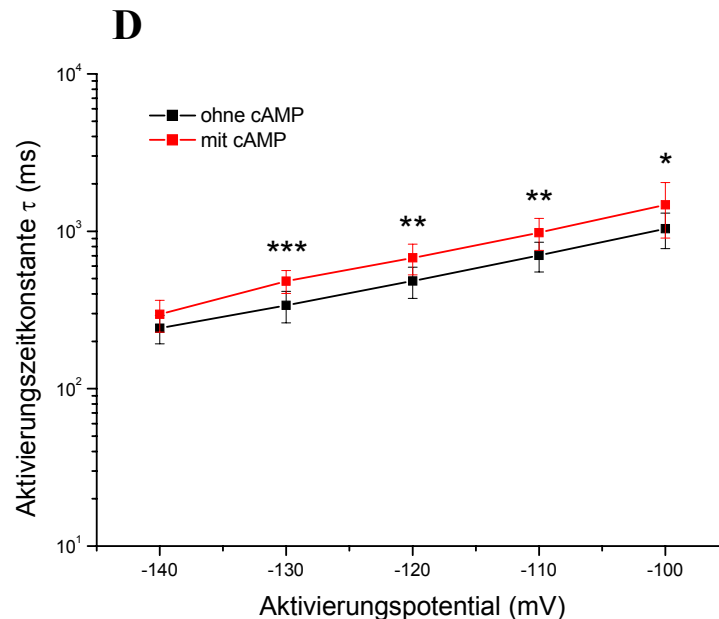
Um noch einmal die Bedeutung des C-Linkers für das cAMP-modulierte Kanal gating zu verdeutlichen, soll abschließend eine Punktmutation in diesem Segment vorgestellt werden, die gravierende Auswirkungen auf das Verhalten des hHCN3-Kanals gegenüber cAMP hat. Es wurden noch einige andere Punktmutationen im C-Terminus durchgeführt, die allerdings keine größeren Auswirkungen hatten.

### 3.2.7. Auswirkungen der Punktmutation H425S auf hHCN3

Bei dieser Punktmutation wurde an Position 425 von hHCN3 die Aminosäure Histidin in die entsprechende Aminosäure Serin aus hHCN2 mutiert. Aminosäure 425 befindet sich im C-Linker kurz vor dem Übergang zur CNBD (Abb. 3.19.A). Der Austausch dieser einen Aminosäure führt zu einer Modulierbarkeit durch cAMP. Allerdings wird der Kanal jetzt **negativ** moduliert, d.h. es kommt zu einer Inhibierung der Kanalaktivität. Die spannungsabhängigen Aktivierungskurven werden durch cAMP zu negativeren Potentialen verschoben, es ist also mehr Energie für die Kanalaktivierung nötig. Der shift von  $V_{1/2}$  beträgt etwa  $-9$  mV (Abb. 3.19.B,C).

Auch die Aktivierungskinetik wird durch Applikation des zyklischen Nukleotids signifikant verlangsamt statt beschleunigt. Nur bei dem maximalen Potential von  $-140$  mV ist kein Effekt auf die Aktivierungsgeschwindigkeit feststellbar (Abb. 3.19.D).





#### Abb. 3.19.: Punktmutation H425S im hHCN3

(A) Schematische Darstellung des mutierten hHCN3-Kanals. In der Mutante ist die Position der eingeführten Punktmutation (Serin aus hHCN2) durch einen grünen Kreis gekennzeichnet.

(B) Spannungsabhängige Aktivierungskurven des mutierten Kanals ohne cAMP (schwarz) und in Gegenwart von 100  $\mu$ M cAMP (rot).

(C) Statistische Auswertung des Potentials der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$

(D) Modulation der Aktivierungsgeschwindigkeit durch 100  $\mu$ M cAMP.

Statistische Signifikanzen: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (jeweils cAMP gegenüber Kontrolle)

Die Werte sind angegeben als Mittelwerte  $\pm$  SD;

$n = 9 - 12$  Zellen pro Bedingung.

### 3.2.8. Vergleich der Aminosäuresequenzen von C-Linker und CNBD der einzelnen hHCN-Subtypen

Abbildung 3.20. zeigt einen Sequenzvergleich von C-Linker und CNBD aller 4 hHCN-Subtypen. Gezeigt sind u.a. diejenigen Aminosäuren von hHCN3, die sich in diesen Regionen von denen der anderen Isoformen unterscheiden. Die Homologie zwischen hHCN3 und den anderen Subtypen beträgt in diesem Proteinabschnitt 80 – 90 %. Die punktuellen Unterschiede könnten allerdings, ähnlich wie die schon dargestellte Punktmutation H425S, entscheidenden Einfluss auf die Regulation des Kanals haben. Für eine volle Wiederherstellung der Modulierbarkeit von hHCN3 durch cAMP muss aber zusätzlich auch ein funktioneller extremer C-Terminus vorhanden sein. In diesem Abschnitt sind die Unterschiede zwischen den Kanal-Subtypen deutlich ausgeprägter, die Homologie beträgt hier nur etwa 20 – 30 %. Der Abbildung ist

außerdem zu entnehmen, dass alle für die Interaktion mit zyklischen Nukleotiden und deren Bindung wichtigen Aminosäuren auch in der CNBD von hHCN3 vorhanden sind.

<b>hHCN3</b>	<b>HATALIQSLDSSRRQYQEKYKQVEQYMSFHKLPADTRQRIHEYEHRYQGKMFDEESILG</b>	<b>404</b>
hHCN1	HATALIQSLDSSRRQYQEKYKQVEQYMSFHKLPADMRQKIHDYYEHRYQGKIFDEENILN	460
hHCN2	HATALIQSLDSSRRQYQEKYKQVEQYMSFHKLPADFRQKIHDYYEHRYQGKMFDEDSILG	520
hHCN4	HATALIQSLDSSRRQYQEKYKQVEQYMSFHKLPDPTRQRIHDYYEHRYQGKMFDEESILG	571
<b>C-Linker</b>		
<b>hHCN3</b>	<b>ELSEPLREEIINF</b> <b>TCRGLVAH</b> <b>MPLFAHADPS</b> <b>FVTA</b> <b>VLTKLRFEVFQPGD</b> <b>LVVREGSVGRK</b>	<b>464</b>
hHCN1	ELNDPLREEIVNFNCRKLVA <b>T</b> MPLFANADPNFVTAMLSKLRFEVFQPGDYIIREGAVGKK	520
hHCN2	ELNGPLREEIVNFNCRKLVA <b>S</b> MPLFANADPNFVTAMLT <b>K</b> LKFEVFQPGDYIIREGTIGKK	580
hHCN4	ELSEPLREEIINFNCRKLVA <b>S</b> MPLFANADPNFVTSMLTKLRFEVFQPGDYIIREGTIGKK	631
<b>CNBD</b>		
<b>hHCN3</b>	<b>MYFIQHGLLS</b> <b>VLARGA</b> <b>DR</b> <b>LT</b> <b>DGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDHFNA</b>	<b>524</b>
hHCN1	MYFIQHG <b>V</b> AGVITKSSKEMK <b>L</b> TDGSYFGEICLLTKGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFNE	580
hHCN2	MYFIQHG <b>V</b> SVLT <b>K</b> GNKEMK <b>L</b> SDGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFNE	640
hHCN4	MYFIQHG <b>V</b> SVLT <b>K</b> GNK <b>E</b> T <b>K</b> LADGSYFGEICLLTRGRRTASVRADTYCRLYSLSVDNFNE	691
<b>Extremer C-Terminus</b>		
<b>hHCN3</b>	<b>VLEEFPMRRAFETVA</b> <b>MDRL</b> <b>LRIGKKN</b> <b>SILQ</b> <b>QRKSEPSPGSSGG</b>	<b>584</b>
hHCN1	VLEEYPMRRAFETVAIDRLDRIGKKN <b>S</b> ILLQ <b>F</b> QKDLNTGVFN	624
hHCN2	VLEEYPMRRAFETVAIDRLDRIGKKN <b>S</b> ILLH <b>K</b> VQHDLSGVFN	684
hHCN4	VLEEYPMRRAFETVALDRLDRIGKKN <b>S</b> ILLH <b>K</b> VQHDLSGVFN	735

**Abb. 3.20.: Sequenzvergleich von CNBD und C-Linker der hHCN-Subtypen**

Die Aminosäuren sind im „single letter-code“ dargestellt, am Zeilenende ist die jeweilige Position der letzten Aminosäure angegeben.

Die C-Linker-Region ist durch grüne Balken markiert, die CNBD durch blaue Balken. Aminosäuren von hHCN3, die sich von denen der anderen Subtypen unterscheiden, sind gelb hinterlegt. Für die Interaktion mit zyklischen Nukleotiden wichtige Aminosäuren in der CNBD sind grau hinterlegt (Zagotta et al., 2003). Der rote Kasten zeigt die Position der Punktmutation H425S (siehe 3.2.7.).

## 4. Diskussion

Die bisher bekannten 4 HCN-Isoformen werden in einer großen Zahl von Geweben exprimiert und der von ihnen getragene  $I_h$ - bzw.  $I_f$ -Strom ist an vielen wichtigen physiologischen Regulationsmechanismen beteiligt. Als eine der bedeutendsten Funktionen ist dabei die Generierung eines depolarisierenden, kationischen Schrittmacherstromes in spontanaktiven Herz- und Nervenzellen zu nennen. Aber auch vielfältige andere Prozesse wie die Kontrolle des Ruhemembranpotentials und der neuronalen Plastizität wird stark von HCN-Kanälen beeinflusst (Robinson, 2003; Pape, 1996).

Durch die Klonierung der Subtypen HCN1,2 und 4 wurde eine genauere Charakterisierung der von ihnen vermittelten Ströme möglich, allerdings nur in künstlichen Expressionssystemen. Die genaue Zusammensetzung der nativen Kanäle ist nicht bekannt, allerdings spricht vieles für heteromere Kanäle, die aus verschiedenen HCN-Subtypen aufgebaut sind. Der Beitrag der verschiedenen Subtypen zur Kanalaktivität konnte *in vivo* bisher nur durch genetische Knock-out Modelle untersucht werden, da spezifische Blocker für die einzelnen HCN-Isoformen nicht verfügbar sind. Für HCN1 (Nolan et al., 2003), HCN2 (Ludwig et al., 2003) und HCN4 (Stieber et al., 2003) sind entsprechende Mausmodelle entwickelt worden und lieferten interessante Ergebnisse. So führt das Fehlen von HCN1-Protein in neuronalen Geweben zu motorischen Defiziten und Veränderungen in der synaptischen Plastizität. Die Deletion des HCN2-Gens im gesamten Organismus führt zu Ataxie und Epilepsie, während ein totaler HCN4-Knockout noch gravierendere Auswirkungen hat und wegen massiver Störungen in der Herzentwicklung zum Tod bereits im Embryonalstadium führt.

Für die HCN3-Isoform liegen im Vergleich sehr wenige Daten zu ihrer Bedeutung *in vivo* vor. Auch eine exakte Analyse der Eigenschaften des durch HCN3 vermittelten Stroms war bis jetzt durch die großen Probleme bei der Expression in Zelllinien nicht möglich. Eine Charakterisierung des murinen HCN3-Kanals wurde erst vor kurzem durch Verwendung eines adenoviralen Expressionssystems erreicht (Mistrik et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit erfolgte nun erstmals die Klonierung, funktionelle Expression und elektrophysiologische Charakterisierung des humanen HCN3-Kanals. Dabei stellte sich heraus, dass diese Isoform eine besondere Stellung innerhalb der hHCN-Kanalfamilie einnimmt, da sie nicht durch zyklische



Nukleotide modulierbar ist. Die molekularen Grundlagen hierfür wurden in der Folge weiter untersucht.

#### **4.1. Charakteristische Eigenschaften des humanen HCN3-Kanals (hHCN3)**

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der mRNA-Expression in menschlichen Geweben zeigt eine durchwegs niedrigere Expression von hHCN3 in verschiedenen Hirnarealen im Vergleich zu hHCN1. Auffällig ist jedoch das starke Signal für hHCN3 im fötalen Gehirn, während hHCN1-mRNA hier nicht detektierbar ist. Dies spricht für eine spezifische Funktion von hHCN3 während der fötalen Hirnentwicklung. Möglicherweise spielt hier die auffälligste Eigenschaft dieser Isoform – die fehlende Modulation durch zyklische Nukleotide – eine entscheidende Rolle für einen reibungslosen Entwicklungsprozess.

Die Expression und elektrophysiologische Analyse von hHCN3 in stabilen Zelllinien zeigte, dass es sich um einen funktionsfähigen Kanal handelt. Wie die anderen hHCN-Subtypen, stellt auch hHCN3 einen durch Hyperpolarisation der Zellmembran aktivierbaren, unselektiven Kationenkanal dar. Sämtliche elektrophysiologischen Parameter liegen im Bereich der anderen 3 Subtypen (Stieber et al., 2005). Die Aktivierungskinetik liegt zwischen der von hHCN2 und hHCN4, während die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (Potential der halbmaximalen Aktivierung  $V_{1/2}$ ) in der Größenordnung von hHCN1 angesiedelt ist. In der Leitfähigkeit für Natrium- und Kaliumionen ist zwischen allen Kanälen kein signifikanter Unterschied festzustellen. Auch das Ausmaß der Blockierung des Ionenflusses durch Cäsiumionen und den spezifischeren Blocker ZD7288 ist bei allen Isoformen vergleichbar.

Der entscheidende Unterschied zwischen hHCN3 und den anderen hHCN-Kanälen ist die fehlende direkte Regulation des Kanalgatings durch zyklische Nukleotide. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten von Mistrik et al. für die murine HCN3-Isoform.

Ein solches Verhalten ist überraschend, da hHCN3 ebenfalls die für die Bindung von cAMP bzw. cGMP entscheidende intrazelluläre Struktur, die sog. „cyclic nucleotide binding domain“ (CNBD), besitzt. Auch die für die Bindung notwendigen Aminosäuren (Zagotta et al., 2003) sind in den CNBDs aller vier Subtypen hoch konserviert.

Der grundlegende Mechanismus der cAMP-abhängigen Kanalaktivierung ist teilweise aufgeklärt und weist dem C-Terminus des Proteins eine entscheidende Bedeutung zu (Wainger et al., 2001). Dabei wurde festgestellt, dass nach Deletion von CNBD und extremem C-Terminus von mHCN1 und mHCN2 die spannungsabhängigen Aktivierungskurven zu positiveren Potentialen verschoben wurden. Die Verschiebung war bei der durch cAMP sehr gut modulierbaren mHCN2-Isoform deutlich ausgeprägter als beim schwach modulierbaren mHCN1. Es zeigte sich also durch die Deletionen insgesamt der gleiche Effekt wie nach Applikation von cAMP. Die Ergebnisse führten zu der Vorstellung, dass der C-Terminus die Aktivierung des Kanals inhibiert. Diese basale Inhibierung wird durch die Deletion bzw. durch cAMP aufgehoben, wodurch es zur Positivverschiebung der spannungsabhängigen Aktivierung kommt und weniger Energie für die Kanalaktivierung aufgewendet werden muss. Gleichzeitig erfolgt auch eine Beschleunigung der Aktivierungskinetik des Kanals. Neuere Untersuchungen zeigen anhand von Röntgen-Kristallstrukturen, dass bei der Modulation durch zyklische Nukleotide Interaktionen zwischen den 4 C-Termini der Homomere eines funktionellen Kanals entscheidend sind (Zagotta et al., 2003). Der genaue Einfluss der Transmembrandomänen ist nicht geklärt.

Betrachtet man die spannungsabhängige Aktivierung der gut modulierbaren Isoformen hHCN2 und hHCN4 in Abwesenheit von cAMP, so erfolgt diese bei wesentlich negativeren Potentialen als bei den beiden anderen Isoformen hHCN1 und hHCN3. Man geht deshalb von einer stärkeren basalen Inhibierung von hHCN2 und hHCN4 durch den C-Terminus aus. Dementsprechend ist auch der Effekt von cAMP, nämlich die Aufhebung der Inhibierung, bei diesen Isoformen viel ausgeprägter. Im Gegensatz dazu werden hHCN1 und hHCN3 bei deutlich positiveren Potentialen aktiviert. Ihre Aktivierungskurven liegen nahe beieinander, d.h. es sollte eine vergleichbare, schwächer ausgeprägte Inhibierung durch den jeweiligen C-Terminus vorliegen. Allerdings wird trotzdem nur hHCN1 signifikant durch cAMP moduliert. Der C-Terminus von hHCN3 scheint demnach keinerlei inhibierenden Effekt auf das basale Kanal gating auszuüben.

Die molekularen Grundlagen für die fehlende Sensitivität gegenüber cAMP sind nicht bekannt. Naheliegend sind nach heutigem Kenntnisstand sicherlich Unterschiede in der Aminosäuresequenz des C-Terminus von hHCN3. Genauer wird darauf noch im zweiten Teil dieser Diskussion eingegangen. Auch die N-terminalen Regionen der verschiedenen hHCN-Isoformen unterscheiden sich erheblich in ihrer Aminosäuresequenz. Für die strukturverwandten CNG-Kanäle wurden Interaktionen zwischen N-Terminus und C-Terminus nachgewiesen, die

Einfluss auf die Kanalaktivierung nehmen (Gordon et al., 1997). Für den N-Terminus von HCN-Kanälen konnte ein solcher Einfluß bisher nicht gezeigt werden (Wang et al., 2001; Viscomi et al., 2001). Bekannt ist allerdings die Bedeutung eines bestimmten Sequenzabschnittes des N-Terminus für die Bildung eines funktionellen Kanals aus 4 Monomeren (Tran et al., 2002). Diese Aminosäuresequenz ist in allen 4 hHCN-Subtypen konserviert.

hHCN3 könnte sich demnach *in vivo* mit anderen hHCN-Isoformen zu heterotetrameren Kanälen zusammenlagern und somit zur Feinabstimmung der cAMP-Modulierung von nativen hHCN-Kanälen beitragen. Dabei steuern die übrigen hHCN-Subtypen die Sensitivität gegenüber cAMP bei, die je nach Subtyp (hHCN1,2 oder 4) wiederum stark variieren kann. hHCN3-Untereinheiten im tetrameren Kanal können gegenregulierend wirken und die Kanalaktivität in Gegenwart von zyklischen Nukleotiden dämpfen. Durch die Kombinationsmöglichkeiten aus verschiedenen Isoformen ist eine feine Regulation des Kanalgatings möglich. Denkbar ist allerdings auch die Bildung von homomeren hHCN3 Kanälen, die dann lediglich zum rein spannungsaktivierten Gesamtstrom einer Zelle bei zunehmender Hyperpolarisation der Zellmembran beitragen. Auch eine Interaktion mit bisher nicht identifizierten regulatorischen Untereinheiten *in vivo*, z.B. mit verschiedenen Kinasen (Zong et al., 2005; Poolos et al., 2006), könnte entscheidend an der Modulation des durch hHCN3-Kanäle vermittelten Stroms beteiligt sein. Bis jetzt konnten allerdings keine Faktoren identifiziert werden, die speziell Einfluss auf die Aktivität der hHCN3-Isoform ausüben.

## **4.2. Molekulare Grundlagen für die fehlende Modulation von hHCN3 durch zyklische Nukleotide**

Die Bedeutung der C-terminalen Region von HCN-Kanälen für die Regulierung der jeweiligen Kanalaktivität ist schon länger bekannt. Dabei spielt die basale Inhibierung der Kanalpore durch die 4 C-Termini eines tetrameren Kanals die entscheidende Rolle (Wainger, 2001). Je stärker diese Inhibition ausgeprägt ist, desto effektiver kann sie durch zyklische Nukleotide wieder aufgehoben werden. Entfernt man den C-Terminus einer HCN-Isoform, so fällt die basale Inhibierung weg. Es erfolgt keine weitere Kanalaktivierung durch cAMP mehr.

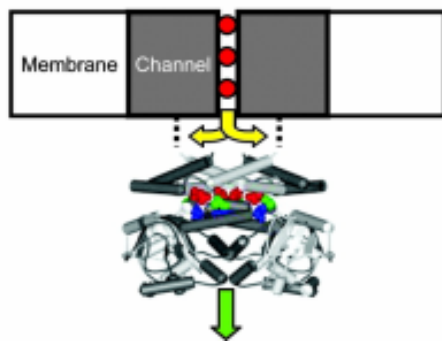
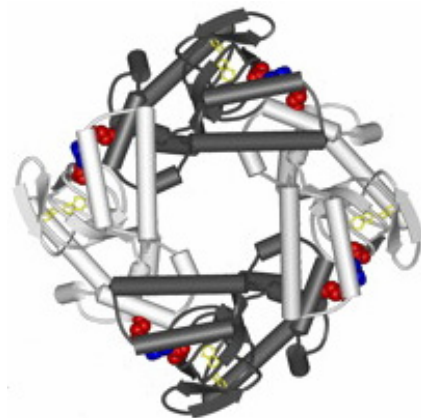
Nach diesem Modell sollte die basale Inhibierung von hHCN3 sehr schwach ausgeprägt sein. Der C-Terminus ist also nicht zu einer funktionellen Hemmung der Kanalaktivität in der Lage. Um dies zu untersuchen, wurde der C-Terminus von hHCN2 eingeführt, was tatsächlich zu einer Wiederherstellung der Sensitivität für cAMP führte. Die fehlende Modulierbarkeit von hHCN3 ist also auf einen „fehlerhaften“ C-Terminus zurückzuführen, bei dem durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz keine basale Inhibition des Kanals mehr möglich ist.

Im Weiteren sollten die verantwortlichen Sequenzunterschiede weiter eingegrenzt werden. Dazu wurden verschiedene chimäre hHCN3-Kanäle hergestellt, bei denen jeweils nur einzelne Teilstücke des C-Terminus gegen das jeweilige Analogon von hHCN2 ausgetauscht wurden. Dabei stellte sich heraus, dass C-Linker, CNBD oder extremer C-Terminus isoliert betrachtet nicht für die fehlende Modulierbarkeit verantwortlich sind. Auch der gemeinsame Austausch von C-Linker und CNBD zeigte keinen Effekt. Dieses Ergebnis ist überraschend, da für die murinen Subtypen mHCN1 und mHCN2 ein deutlicher Einfluss auf die cAMP-Sensitivität durch den gemeinsamen Austausch dieser Regionen beschrieben wurde (Wang et al., 2001). In diesen Studien konnte nach Einführen der Teilbereiche aus mHCN2 der in mHCN1 ansonsten nur schwach ausgeprägte Effekt von cAMP auf die Kanalaktivität deutlich gesteigert werden. Im Falle von hHCN3 liegt deshalb nach Einführen eines „richtigen“, kompletten C-Terminus aus hHCN2 wahrscheinlich ein eigenständiger Mechanismus für die Modulation durch zyklische Nukleotide vor, der sich nicht auf andere HCN-Subtypen übertragen lässt. Möglicherweise tragen hierzu auch Sequenzunterschiede in den Transmembranregionen von hHCN3 bei. Es müssen offensichtlich Interaktionen zwischen allen Teilbereichen des C-Terminus und zusätzlich zwischen C-Terminus und den Transmembrandomänen stattfinden, um die notwendigen Konformationsänderungen für eine Modulation durch cAMP zu ermöglichen.

Der „native“ C-Terminus von hHCN3 zeigt also in Gegenwart von cAMP im Gegensatz zu den anderen hHCN-Isoformen keine Tendenz zur Ausbildung einer Konformation, die die Kanalaktivität verstärkt. Dies lässt sich mit neueren Modellen zur Liganden-gesteuerten Kanalaktivierung in Einklang bringen (Zagotta et al., 2003; Johnson & Zagotta, 2005; Ulens & Siegelbaum, 2003).

Untersuchungen an der Röntgen-Kristallstruktur von C-Linker und CNBD des murinen HCN2-Kanals in Gegenwart von cAMP deuten auf die Bildung eines 4-fach symmetrischen „gating ring“ hin, der zu einer verstärkten Aktivierung des Kanals führt (Zagotta et al., 2003). Dieser

„Ring“ setzt sich aus den 4 C-Termini eines tetrameren Kanals zusammen. Entscheidend für die Zusammenlagerung zum funktionellen „gating ring“ ist dabei hauptsächlich die Interaktion der C-Linker der einzelnen Kanaluntereinheiten untereinander. Die Wechselwirkungen zwischen den jeweiligen CNBDs sind dagegen nur schwach ausgeprägt. In Abwesenheit von cAMP liegen die 4 C-Termini eines Kanals als 2-fach symmetrisches „Dimer eines Dimers“ vor, d.h. jeweils 2 benachbarte C-Termini bilden ein Dimer (Ulens & Siegelbaum, 2003). Durch Bindung von zyklischen Nukleotiden und die dadurch gewonnene Energie werden Konformationsänderungen der C-Termini ermöglicht. Dies erlaubt dann die Interaktion der einzelnen C-Linker-Regionen der vier hHCN-Untereinheiten und schließlich die Bildung des „gating ring“. Der Ring reguliert dabei zwar den Kationenfluss durch die Kanalpore, es fließen allerdings keine Ionen durch seine stark negativ geladene zentrale Porenregion (Johnson & Zagotta, 2005). Die Ionen diffundieren bereits kurz nach verlassen der leitenden Kanalpore ins Cytosol ab (Abb. 4.1.). Der Ring ist somit nicht Teil des Permeationsweges der Ionen.

**A****B**

**Abb. 4.1.: Schematische Darstellung des „gating ring“ eines HCN-Kanals**

(A) Die Abbildung zeigt den von den C-Termini eines Kanals gebildeten Ring in Seitenansicht. Die Struktur berücksichtigt dabei nur die C-Linker-Region und CNBD, nicht aber den extremen C-Terminus. Die Pfeile markieren mögliche Permeationswege der Kationen. Die Ionen könnten vor dem Ring aus dem Kanal austreten (gelbe Pfeile) oder erst nach Permeation durch die zentrale Ringpore (grüner Pfeil).

(B) Aufsicht von oben auf einen „gating ring“ aus 4 Untereinheiten. Gegenüberliegende C-Termini sind in der gleichen Farbe dargestellt. Gebundene zyklische Nukleotide sind in gelb eingefügt.

Abb. A aus Johnson & Zagotta, 2005

Abb. B aus Craven & Zagotta, 2004

Nach dem eben erläuterten Modell wird die Kanalaktivität also durch einen dynamischen Prozess aus Bildung und Rückbildung des „gating ring“ reguliert. Welche Konformation des C-Terminus dabei bevorzugt wird, ist von den gerade herrschenden Konzentrationen an zyklischen Nukleotiden in der Umgebung des Kanals abhängig.

Das Modell von Zagotta et al. lässt für das fehlende Ansprechen von hHCN3 im wesentlichen zwei mögliche Erklärungen zu:

(1) Durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz im C-Terminus von hHCN3 wird schon in Abwesenheit von cAMP die 4-fach symmetrische Ring-Konformation energetisch bevorzugt. In Anwesenheit von cAMP wird dagegen diese Konformation destabilisiert und der Übergang zur Konformation eines doppelten Dimers der C-Termini begünstigt. Dadurch kommt es in Gegenwart von cAMP zur Inhibition der Kanalaktivität. Für diese Erklärung spricht der inhibierende Effekt von zyklischen Nukleotiden auf die murine HCN3-Isoform (Mistrik et al., 2005). Es kommt hier zu einer statistisch signifikanten Negativ-Verschiebung des Potentials der halbmaximalen Kanalaktivierung ( $V_{1/2}$ ). Bei Messungen am humanen HCN3-Kanal ergeben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede (3.1.3.5.).

(2) Der Kanal liegt immer in der Konformation mit „gating ring“ vor. Es kommt in Anwesenheit von zyklischen Nukleotiden nicht zu Änderungen in der Konformation des C-Terminus, die die Kanalaktivität signifikant beeinflussen. Durch bestimmte permanente Wechselwirkungen zwischen den 4 C-Termini eines Kanals könnte der Kanal in der Ring-Konformation arretiert sein, so dass durch cAMP weder eine Aktivierung noch eine Inhibition bewirkt wird. Diese Erklärung wäre im Einklang mit den Messergebnissen für den humanen HCN3 im Rahmen dieser Arbeit. Zyklische Nukleotide zeigen hier keine signifikanten Effekte auf die Kanalaktivität. Der leicht inhibierende Effekt kann eher als „run-down“-Phänomen des Kanals während des Messzeitraums gedeutet werden.

Da die Aminosäuresequenzen der C-Termini von murinem (mHCN3) und humanem HCN3 (hHCN3) nicht völlig identisch sind (Homologie: etwa 95%), können auch die Konformationsänderungen und damit verbundene Wechselwirkungen zwischen Aminosäureresten in Gegenwart von zyklischen Nukleotiden unterschiedlich sein. Dies kann in der Folge dann unterschiedliche Auswirkungen auf die Kanalaktivität haben, was eine Erklärung

für die leichten Unterschiede zwischen den beiden HCN3-Isoformen in der Modulierbarkeit durch cAMP wäre.

### 4.3. Ausblick

Die Klonierung und funktionelle Expression ermöglicht die weitere, detailliertere Untersuchung der hHCN3-Isoform und ihrer speziellen Eigenschaften. Besonderes Augenmerk wird hier sicher auf den genauen molekularen Grundlagen für die fehlende Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide liegen. Es muss noch eine genauere Analyse der Sequenzunterschiede im kompletten C-Terminus von hHCN3 im Vergleich zu hHCN2 erfolgen. Dazu ist die Herstellung und Analyse weiterer Kanalmutanten erforderlich.

Ein noch wichtigerer Punkt ist die Aufklärung der physiologischen Rolle und Relevanz von hHCN3 als hauptsächlich spannungsabhängige hHCN-Isoform. Vor allem die starke Expression von hHCN3 im fötalen menschlichen Gehirn (3.1.2.) weist auf eine sehr spezifische Funktion dieser Isoform in der Hirnentwicklung hin. Dieses Ergebnis sollte zusätzlich am Mausmodell überprüft und eine genauere Analyse der lokalen und zeitlichen Expression durchgeführt werden. Durch das Fehlen von Subtyp-spezifischen Kanalblockern werden vorwiegend genetische Ansätze nötig sein, um die Funktion des HCN3-Kanals *in vivo* genauer zu untersuchen. Denkbar ist dabei die Generierung von „Knock-out“-Mäusen, bei denen das HCN3-Gen entweder im gesamten Organismus oder alternativ nur in bestimmten Geweben (z.B. hirnspezifisch) deletiert wird. Diese Mauslinien erlauben neben grundlegenden molekularbiologischen Analysen vor allem auch elektrophysiologische Messungen in verschiedensten Geweben. Durch gezielte Deletion des HCN3-Kanals kann so der Beitrag dieser HCN-Isoform zur elektrischen Aktivität bestimmter Zelltypen und –populationen bestimmt werden. Möglich wären solche Messungen je nach Gewebe entweder an isolierten Zellen oder im Gewebeschnitt.

Offen ist auch die Frage, ob die HCN3-Isoform *in vivo* zur Formation von heteromeren Kanälen mit anderen HCN-Subtypen in der Lage ist oder ob homotetramere Kanäle vorliegen. Für die murine HCN3-Isoform konnte in Zellkulturmodellen die Bildung von Heteromeren mit mHCN1 bzw. mHCN4 nachgewiesen werden. Mit mHCN2 wurden jedoch keine heteromeren Kanäle ausgebildet. (Much et al., 2003). Hier spielen im lebenden Organismus vielleicht noch

unbekannte Interaktionspartner eine Rolle. Die Identifizierung von möglichen neuen regulatorischen Untereinheiten, die Einfluss auf die HCN3-Isoform nehmen, wäre ebenfalls ein Ziel zukünftiger Studien.

Da über die Funktion von HCN3 noch nicht sehr viel bekannt ist, bietet sich hier mit Sicherheit ein großes Betätigungsfeld für weitere Untersuchungen.



## 5. Zusammenfassung

Der hyperpolarisationsaktivierte, durch zyklische Nukleotide modulierte Kationenstrom  $I_h$  ( $I_f$  im Herzen) und sein Vorkommen in verschiedensten Zelltypen sind schon seit langer Zeit bekannt. Die genetischen und molekularen Grundlagen, die diesen Strom vermitteln, konnten allerdings erst vor einigen Jahren entschlüsselt werden. Dabei wurde eine Genfamilie mit 4 verschiedenen Subtypen (HCN1 – 4) identifiziert und teilweise kloniert. In den folgenden Jahren konnten die Subtypen HCN1, 2 und 4 in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften detailliert analysiert werden. Für den murinen HCN3-Subtyp lagen aufgrund von Expressionsproblemen nur unzureichende Daten vor, während der humane HCN3-Kanal nicht untersucht wurde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *humane* HCN3-Isoform (hHCN3) kloniert, erfolgreich in einem Zellkultursystem exprimiert und anschließend elektrophysiologisch charakterisiert. Dabei stellte sich heraus, dass diese Isoform funktionelle homotetramere Kanäle ausbildet und sich die grundlegenden elektrophysiologischen Parameter im Bereich der anderen 3 hHCN-Subtypen bewegen. Es handelt sich auch bei hHCN3 um einen durch Hyperpolarisation der Plasmamembran aktivierbaren, unselektiven Kationenkanal, der für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  permeabel ist. Allerdings zeigt hHCN3 einen entscheidenden Unterschied zu den anderen Mitgliedern der Kanalfamilie. Während hHCN1, 2 und 4 durch zyklische Nukleotide direkt in ihrer Kanalaktivität beeinflusst werden, zeigt die hHCN3-Isoform keine Sensitivität gegenüber zyklischen Nukleotiden. Es erfolgt durch cAMP/cGMP weder eine Verschiebung der spannungsabhängigen Aktivierungskurven zu positiveren Aktivierungspotentialen, noch eine Beschleunigung der Kinetik der Kanalaktivierung.

Die molekularen Ursachen für die fehlende Modulierbarkeit durch zyklische Nukleotide konnte im C-Terminus des Kanalproteins lokalisiert werden. Der Austausch dieser Region gegen den C-Terminus der gut modulierbaren hHCN2-Isoform führte zur Wiederherstellung des Ansprechens auf cAMP. Unterschiede in der Aminosäuresequenz dieser Kanalregion sind demnach dafür verantwortlich, dass trotz des Vorhandenseins einer funktionellen Bindedomäne für zyklische Nukleotide (CNBD) durch diesen „falschen“ C-Terminus kein Effekt von cAMP vermittelt werden kann. Eine weitere Eingrenzung auf wichtige Teilbereiche der C-terminalen Region war bis jetzt nicht möglich. Entscheidend scheinen für die Modulation also korrekte Interaktionen und Konformationsänderungen innerhalb des gesamten C-Terminus des Proteins zu sein.

Die physiologische Bedeutung und Relevanz des nicht cAMP-abhängigen hHCN3-Kanals muss in weiteren Studien noch genauer untersucht werden.

## 6. Anhang

### 6.1. Primer

Tab. 6.1. zeigt die Sequenzen der für die Klonierungen und Sequenzierungen verwendeten Primer. Alle Primer wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, bezogen. Klonierungsprimer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/μl, Sequenzierprimer in einer Konzentration von 0,8 pmol/μl eingesetzt.

„f“ steht in der Tabelle für *forward*, „r“ für *reverse*.

Primer	Gen	Sequenz in 5'-3' Richtung
h1sonde1f	hHCN1	TGTCATTTCAGGATCCACCCTGAATTCCACATCGTC
h1sonde1r	hHCN1	GCTTGAACCTGGTACCCTGCTGTTGCATGAGTGACA
h2sonde1f	hHCN2	TACTTAGATGGATCCAGCTTCATGCAGCGCCAGTT
h2sonde1r	hHCN2	GTATCAATAGGTACCTCCTTGAAGAAGGTGATGCC
h3sonde1f	hHCN3	TGGATCCTAGGATCCTATTGTCTGATACTTTCTTCC
h3sonde1r	hHCN3	AAATGGCGCGTGGTACCGCGTCCAACCGTGGCTCCAG
h4sonde1f	hHCN4	AATCAGACTGGATCCCAGTGGGAGCAGCGGGGGCC
h4sonde1r	hHCN4	GAATTGGCTGGTACCTGGCAGTTTGGAGCGCACTG
h3clinkerh2f1	hHCN3/hHCN2	CCACTGCCCTCATCCAGTCCCTGGACTCCTCGCGGCGC
h3clinkerh2f2	hHCN3/hHCN2	CGCCAACGCCGACCCCAACTTCGTCACTGCAGTTCTCA
h3clinkerh2r1	hHCN3/hHCN2	TTGGTGAGAACTGCAGTGACGAAGTTGGGGTCGGCGTTGGCGAA
h2cth31f	hHCN2/hHCN3	CACGGCACTCATCCAGTCGCTGGACTCTTCCCGGCGTC
h2cth31r	hHCN2/hHCN3	GCGCCGCGAGGAGTCCAGGGACTGGATGAGGGCAGTGG
h3cth21r	hHCN3/hHCN2	ACGCCGGAAGAGTCCAGCGACTGGATGAGTGCCGTGG
h3h425sf1	hHCN3	TGTCGGGGCCTGGTGGCCTCTATGCCGCTGTTTGCCCA
h3h425sr1	hHCN3	CAAACAGCGGCATAGAGGCCACCAGGCCCCGACAGGTGAA
h3cnbdh2f1	hHCN3/hHCN2	TTGCCCATGCCGACCCAGCTTCGTACACGGCCATGCTGAC
h3cnbdh2r1	hHCN3/hHCN2	CAGCATGGCCGTGACGAAGCTGGGGTCGGCATGGGCAAAC
h3cnbdh2f2	hHCN3/hHCN2	AGAAGAATTCCATCCTCCTGCGGAAGCGCTCCGAGCCAAG
h3cnbdh2r2	hHCN3/hHCN2	TGGCTCGGAGCGCTTCCGCAGGAGGATGGAATTCTTCTTG
h3cnbdh21fw	hHCN3/hHCN2	GGCACTCATCCAGTCCCTGGACTCCTCGCGGCGCCAGTAC
h3cnbdh21r	hHCN3/hHCN2	GTACTGGCGCCGCGAGGAGTCCAGGGACTGGATGAGTGCC
h3cnbdh22r	hHCN3	GGATGATGGCGTTCTCCTGGTTGTT
h2-1f	hHCN2	AAGCTCAAGTTCGAGGTC
h2-2f	hHCN2	TCTATTCGCTGAGCGTGG
h2-3f	hHCN2	GGACTACATCTTCCTTATTGTG

Primer	Gen	Sequenz in 5' - 3' Richtung
h2-5f	hHCN2	CATGACGGACATCTGGCTGA
h2-1f(1)	hHCN2	AAGCTCAAGTTCGAGGTC
h2-1f(2)	hHCN2	GCGCCAGTTCGGCGCGCT
gsh2-1f	hHCN2	AGCATGACCTCAACTCGG
gsh2-1r	hHCN2	CGCCGACTTGACGCGCGCTC
gsh2-2f	hHCN2	ACCGCGGACCTCGCCCTA
gsh2-2r	hHCN2	TTGGCCGTGCTCGCCGCG
h2-4r	hHCN2	GCGTGAGAGGCGCAGCAGCCGCA
h3-2f	hHCN3	ATGGAGGCAGAGCAG
h3-3f	hHCN3	GCCACGGCACTCATCCAGTCCCTGGAC
h3-10f	hHCN3	ACCATGCTCAGCATGATC
h3-4r	hHCN3	ACTGACGCCGGGAAGAGTCCAGGGACT
h3-6f	hHCN3	GATGGTGGGGAACCTCAT
h3-7f	hHCN3	TCCGCTACATACACCAGT
h3-8f	hHCN3	CAGCATGGGCTGCTCAGT
h3-9f	hHCN3	CATGCGCCCCTTCAGGCA
h3-10f	hHCN3	ACCATGCTCAGCATGATC

Tab. 6.1.: Verwendete Primer

## 7. Literaturverzeichnis

### 7.1. Zitierte Veröffentlichungen

Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C et al., 2003. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 549: 347-59

Baruscotti M, Bucchi A, DiFrancesco D, 2005. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther* 107: 59-79

Birnboim H, Doly J, 1979. A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid. *Nucl Acids Res* 7: 1513-8

BoSmith RE, Briggs J, Sturgess NC, 1993. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization-activated inward current (I<sub>f</sub>) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 110: 343-9

Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ, 1979. How does adrenalin accelerate the heart? *Nature* 280: 235-6

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA, 2001. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotides. *J Gen Physiol* 117: 491-504

Chirgwin J, Przybyla A, Macdonald R, Rutter W, 1979. Isolation of biologically active RNA from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-9

Craven KB, Zagotta WN, 2004. Salt bridges and gating in the COOH-terminal region of HCN2 and CNGA1 channels. *J Gen Physiol* 124: 663-77

DiFrancesco D, 1982. Block and activation of the pacemaker channel in calf purkinje fibres: effects of potassium, caesium and rubidium. *J Physiol* 329: 485-507

DiFrancesco, Tortora P, 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145-7

Doyle D, Cabral J, Pfuetzner R, Kuo A, Gulbis J et al., 1998. The structure of the potassium channel: Molecular basis of K<sup>+</sup>-conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77

Fain GL, Quandt FN, Bastian BL, Gerschenfeld HM, 1978. Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272: 466-9

Feinberg A, Vogelstein B, 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13

- Gauss R, Seifert R, Kaupp UB, 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583-7
- Gordon SE, Varnum MD, Zagotta WN, 1997. Direct interaction between amino- and carboxyl-terminal domains of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 19: 431-41
- Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R, 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74
- Gravante B, Barbuti A, Milanesi R, Zappi J, Viscomi N et al., 2004. Interaction of the pacemaker channel HCN1 with filamin A. *J Biol Chem* 279: 43847-53
- Halliwel JV, Adams PR, 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 250: 71-92
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ, 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100
- Hanahan D, 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-80
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H, 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835-9
- Johnson JP Jr, Zagotta WN, 2005. The carboxyl-terminal region of cyclic nucleotide-modulated channels is a gating ring, not a permeation path. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2742-7
- Ludwig A, Budde T, Stieber J, Moosmang S, Wahl C, 2003. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. *Embo J* 22: 216-24
- Ludwig A, Flockerzi V, Hofmann F, 1997. Regional expression and cellular localisation of the alpha 1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* 17: 1339-49
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M, 1999. Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem* 9: 179-86
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M, 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-91
- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M, 1999. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *Embo J* 18: 2323-9
- Macri V, Accili EA, 2004. Structural elements of instantaneous and slow gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 279: 16832-46
- Manniko R, Elinder F, Larsson HP, 2002. Voltage-sensing mechanism is conserved among ion channels gated by opposite voltages. *Nature* 419: 837-41

- Mistrik P, Mader R, Michalakakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M, 2005. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 280: 27056-61
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A, 1999. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol Chem* 380: 975-80
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A, 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 268: 1646-52
- Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T et al., 2001. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f). *J Biol Chem* 276: 29233-41
- Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A, 2003. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 278: 43781-6
- Munsch T, Pape HC, 1999. Modulation of the hyperpolarization-activated cation current of rat thalamic relay neurons by intracellular pH. *J Physiol* 519 Pt 2: 493-504
- Neher E, Sakmann B, 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802
- Nolan MF, Malleret G, Lee KH, Gibbs E, Dudman JT et al., 2003. The hyperpolarization-activated HCN1 channel is important for motor learning and neuronal integration by cerebellar purkinje cells. *Cell* 115: 551-64
- Noma A, Irisawa H, 1976. A time and voltage-dependent potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch* 366: 251-8
- Pape HC, 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 299-327
- Pfeifer A, Dostmann W, Sausbier M, Klatt P, Ruth P, Hofmann F, 1999. cGMP-dependent protein kinases: Structure and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 135: 105-50
- Poolos NP, Bullis JB, Roth MK, 2006. Modulation of h-channels in hippocampal pyramidal neurons by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 26: 7995-8003
- Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, Doronin SV, Larsen M et al., 2004. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 279: 43497-502
- Robinson RB, Siegelbaum SA, 2003. Hyperpolarization-activated cation currents: From molecules to Physiological Function. *Annu Rev Physiol* 65: 453-80
- Saiki K, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R et al., 1988. A primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91

- Sakmann B, Neher E, 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 46: 455-72
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER et al., 1998. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-29
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT et al., 1999. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 85: E1-6
- Shin KS, Rothberg BS, Yellen G, 2001. Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate. *J Gen Physiol* 117: 91-101
- Stevens DR, Seifert R, Bufer B, Muller F, Kremmer E et al., 2001. Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413: 631-5
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Loster J, Feil R et al., 2003. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15235-40
- Stieber J, Stöckl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F, 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem* 280: 34635-43
- Tran N, Proenza C, Macri V, Petigara F, Sloan E et al., 2002. A conserved domain in the NH<sub>2</sub> terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels. *J Biol Chem* 277: 43588-92
- Uhlen C, Siegelbaum SA, 2003. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. *Neuron* 40: 959-70
- Uhlen C, Tytgat J, 2001. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 276: 6069-72
- Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR, 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805-10
- Wang J, Chen S, Siegelbaum SA, 2001. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J Gen Physiol* 118: 237-50
- Yu H, Wu J, Potapova J, Wymore RT, Holmes B et al., 2001. Mink-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res* 88: E 84-7
- Zagotta WN, Olivier NB, Black KD, Young EL, Olson R et al., 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425: 200-5

---

Zong X, Eckert C, Yuan H, Wahl-Schott C, Abicht H et al., 2005. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src Kinase. *J Biol Chem* 280: 34224-32

Zong X, Stieber J, Ludwig A, Hofmann F, Biel M, 2001. A single histidine residue determines the pH sensitivity of the pacemaker channel HCN2. *J Biol Chem* 276: 6313-9



---

## 7.2. Eigene Veröffentlichungen

Stöckl G, Stieber J, Hofmann F, 2005. Characterization and cAMP-modulation of the human hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 3 (hHCN3). *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371 (Supplement 1): R16/64

Stieber J, Stöckl G, Herrmann S, Hassfurth B, Hofmann F, 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J Biol Chem* 280: 34635-43

Sieber J, Wieland K, Stöckl G, Ludwig A, Hofmann F, 2006. Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. *Mol Pharmacol* 69: 1328-37

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich allen herzlich danken, die diese Arbeit ermöglicht und zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

PD Dr. Juliane Stieber, die mich die ganze Zeit über sehr geduldig und engagiert betreut hat und stets ein offenes Ohr für alle Probleme hatte... Es war vor allem im Bereich Elektrophysiologie eine sehr lehrreiche Zeit, die von einer (fast) immer angenehmen und freundschaftlichen Atmosphäre geprägt war. Vielen Dank für die Unterstützung, Juliane.

Prof. Dr. Franz Hofmann danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten. Dies war im Nachhinein sicher ein Glücksgriff für mich. Ich danke ihm auch für sein Engagement für ein (fast) immer angenehmes Arbeitsumfeld, das sicher erheblich zum Gelingen der Arbeiten am Institut beiträgt.

Prof. Dr. Martin Biel danke ich für seine sehr gelungene, Interesse weckende Pharmakologie-Vorlesung während meines Studiums an der LMU und die unkomplizierte Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Andreas Ludwig danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, auch ihn bei Bedarf immer um Rat fragen zu können.

Prof. Dr. Thomas Kleppisch danke ich für die zwei Euro, die ich für meinen souveränen letzten Platz beim WM-Tippen 2006 als Trostpreis erhalten habe... Eine große Geste. Aber auch für die vielen anregenden Diskussionen rund um Ionenkanäle, Radfahren, Fußball usw.

Ich danke allen Mitarbeitern des Institutes für das angenehme Umfeld, ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit. Besonders erwähnt sei hier der zweite Stock und seine „Bewohner“: Astrid, Susanne, Angela, Nicole, Toni, Steffi, Peter, Carl, Sven, Lior, Dominik, Memo. Die Atmosphäre war immer spitze und die Zeit mit Euch war super. Speziell auch dem unermüdlichen Paul bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Alle, die nicht ausdrücklich erwähnt sind, mögen mir verzeihen und dürfen sich trotzdem angesprochen fühlen.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meinen Eltern, die all das erst ermöglicht haben und Susanne Büttner für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

# **Lebenslauf**

## **Persönliche Daten**

Name Georg Peter Stöckl  
Adresse St.-Martin-Straße 44 A  
D-81541 München

Geburtsdatum 24. Juli 1976  
Geburtsort Wolfratshausen

## **Schulausbildung**

Sept. 1983 – Juli 1987 Grundschule Königsdorf  
Sept. 1987 – Juli 1996 Gymnasium Geretsried  
Abschluß: Abitur (allgemeine Hochschulreife)

## **Studium**

Nov. 1997 – Aug. 1999 Grundstudium Pharmazie an der LMU München  
Aug. 1999 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Nov. 1999 – März 2002 Hauptstudium Pharmazie an der LMU München  
März 2002 – April 2002 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Juni 2003 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung  
Juli 2003 Approbation als Apotheker

## **Pharmaziepraktikum**

Mai 2002 – Okt. 2002 Haupt Pharma Wolfratshausen GmbH  
Nov. 2002 – April 2003 Oleander-Apotheke München

## **Wissenschaftliche Tätigkeit**

Sept. 2003 – Dez. 2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für  
Pharmakologie und Toxikologie der TU München  
(Direktor: Prof. Dr. F. Hofmann)

## **Berufliche Tätigkeit**

seit April 2007 Sandoz International GmbH, 85737 Ismaning